

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-512996

(P2017-512996A)

(43) 公表日 平成29年5月25日(2017.5.25)

(51) Int.Cl.

GO1N 33/68 (2006.01)  
 GO1N 33/50 (2006.01)  
 GO1N 33/48 (2006.01)

F 1

GO1N 33/68  
 GO1N 33/50  
 GO1N 33/48

テーマコード(参考)

2 GO 4 5

Z  
Z

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 60 頁)

(21) 出願番号 特願2016-558687 (P2016-558687)  
 (86) (22) 出願日 平成27年3月26日 (2015.3.26)  
 (85) 翻訳文提出日 平成28年11月14日 (2016.11.14)  
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2015/052243  
 (87) 国際公開番号 WO2015/145387  
 (87) 国際公開日 平成27年10月1日 (2015.10.1)  
 (31) 優先権主張番号 14161766.2  
 (32) 優先日 平成26年3月26日 (2014.3.26)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 511012983  
 メタノミクス ヘルス ゲーエムベーハー  
 ドイツ連邦共和国 10589 ベルリン  
 , テグラー ヴェーク 33  
 (74) 代理人 100091096  
 弁理士 平木 祐輔  
 (74) 代理人 100118773  
 弁理士 藤田 節  
 (74) 代理人 100122389  
 弁理士 新井 栄一  
 (74) 代理人 100111741  
 弁理士 田中 夏夫  
 (74) 代理人 100169971  
 弁理士 菊田 尚子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】代謝産物パネルに基づく血液サンプルの品質の決定のための手段および方法

## (57) 【要約】

血液製剤サンプルの品質を評価する方法であって、前記サンプル中で、本発明の少なくとも1つのマーカーパネルのマーカーの値を決定するステップ、決定した値を対応する参考値と比較するステップ、および前記血液サンプルの品質を評価するステップを含む、方法。

【選択図】なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

血液製剤サンプルの品質を評価する方法であって、以下のステップ：

a) 前記サンプル中で、表1の少なくとも1つのパネルのマーカーの値を決定するステップ；

b) ステップa)で決定した値を対応する参照値と比較するステップ、および

c) 前記血液製剤サンプルの品質を評価するステップ

を含む、前記方法。

**【請求項 2】**

ステップa)において、マーカーである(i) グリセロール-3-リン酸、グリセレート、およびオルニチン；(ii) グリセロール-3-リン酸、グリセレート、およびヒポキサンチン；(iii) グリセロール-3-リン酸、オルニチン、およびヒポキサンチン；または(iv) グリセレート、オルニチン、およびヒポキサンチンの量が決定される、請求項1に記載の方法。 10

**【請求項 3】**

ステップa)において、表2の少なくとも1つのパネルのマーカーの値が決定される、請求項1または2に記載の方法。

**【請求項 4】**

ステップa)において、表2のパネル3、13、15、18、19、または20のうちの少なくとも1つのマーカーの値が決定される、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。 20

**【請求項 5】**

前記マーカーの値を決定するステップが、前記マーカーの量を決定するステップであるか、またはマーカーの少なくとも1つの濃度値から誘導される計算値、好ましくは少なくとも2つのバイオマーカーの濃度の比を決定するステップである、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

**【請求項 6】**

前記マーカーの個々の数値が、多変量モデル、好ましくはロジスティック回帰モデルを用いることにより組み合わせ値に変換される、請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

**【請求項 7】**

前記ステップb)が、以下のステップ：

b1) ステップa)において言及される前記マーカーの決定値に基づいて組み合わせ値を計算するステップであって、好ましくは前記組み合わせ値の計算において該マーカーがそれらの重要性によって重みづけされる、前記ステップ；および

b2) このようにして計算された組み合わせ値を参照組み合わせ値に対して比較するステップ

を含む、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

**【請求項 8】**

前記ステップb)が、以下のステップ：

b1) ステップa)で決定した値を対応する参照値と比較し、前記比較に基づいて組み合わせ値を計算するステップであって、好ましくは前記組み合わせ値の計算において該マーカーがそれらの重要性によって重みづけされる、前記ステップ；および

b2) このようにして計算された組み合わせ値を参照組み合わせ値に対して比較するステップ

を含む、請求項1～6のいずれか1項に記載の方法。

**【請求項 9】**

血液製剤サンプルの品質を評価するステップが、前記血液製剤サンプルが交絡因子である(i) 静脈切開と血液細胞からの血漿の分離との間の長時間、(ii) 静脈切開と血液細胞からの血漿の分離との間の増加温度、(iii) 血漿の長時間の保存、および(iv) 血漿の保存中の増加温度、のいずれかによる影響を受けていないことを保証するステップである、請求項1～8のいずれか1項に記載の方法。 50

**【請求項 10】**

ステップa)において、付加的にマーカーであるエチレンジアミン四酢酸(EDTA)、シトレート、およびアスパルテートの量を決定し、ステップb)において、前記付加的なマーカーの量を対応する参照値に対して比較する、請求項1～9のいずれか1項に記載の方法。

**【請求項 11】**

血液製剤サンプルの品質を評価するステップが、前記サンプルが、採血管選択に関連する因子により損なわれているか否かを識別するステップをさらに含む、請求項10に記載の方法。

**【請求項 12】**

前記血液製剤サンプルが、血液サンプルまたは血漿サンプルである、請求項1～10のいずれか1項に記載の方法。

**【請求項 13】**

血液製剤サンプルの品質を評価するためのデバイスであって、以下のもの：

a) 少なくとも、表1、表2、または表2aの少なくとも1つのパネルのマーカーに対する少なくとも1つの検出器を含む前記サンプルの分析ユニットであって、前記少なくとも1つの検出器が前記サンプル中の前記マーカーの量を決定する、前記分析ユニット、およびそれに機能的に連結されている、

b) データ処理ユニットとデータベースとを含む評価ユニットであって、前記データベースは保存された対応する参照値を含み、前記データ処理ユニットは、2つのバイオマーカーのサンプル内比を計算し、分析ユニットにより決定されたマーカーの値または評価ユニットにより計算された値を前記保存された参照値に対して比較し、それに基づいて品質の評価が確立される出力情報を生成する、実体的に埋め込まれたアルゴリズムを任意選択で有する、前記評価ユニット

を含む、前記デバイス。

**【請求項 14】**

前記分析ユニットが、少なくとも、マーカーであるグリセロール-3-リン酸、グリセレート、およびオルニチンに対する少なくとも1つの検出器を含み、前記少なくとも1つの検出器が前記サンプル中の前記マーカーの量を決定する、請求項13に記載のデバイス。

**【請求項 15】**

血液製剤サンプルの十分な品質または不十分な品質を示す、少なくとも、表1の少なくとも1つのパネルのマーカーの特性値を含むデータコレクション。

**【請求項 16】**

請求項15のデータコレクションを含むデータ保存媒体。

**【請求項 17】**

血液製剤サンプルの品質を評価するための、少なくとも、表1の少なくとも1つのパネルのマーカーの使用、またはそれらの検出剤もしくは検出試薬の使用。

**【請求項 18】**

ハウジング中に含まれる、少なくとも、表1の少なくとも1つのパネルのマーカーに対する少なくとも1つの検出剤、および/または前記マーカーの参照を含む、血液製剤サンプルの品質を評価するためのキット。

**【請求項 19】**

十分な品質の血液製剤のコレクションを提供する方法であって、以下のステップ：

a) 血液製剤のコレクションを提供するステップ、  
b) 前記血液製剤のコレクションの各メンバーのサンプルに、請求項1～12のいずれか1項に記載の血液製剤サンプルの品質を評価する方法のステップを実施するステップ、

c) 不十分な品質が評価される場合には血液製剤を廃棄し、および/または不十分な品質が評価される場合には血液製剤をさらなる使用から除外し；これにより十分な品質の血液製剤のコレクションを提供するステップ

を含む、前記方法。

**【発明の詳細な説明】**

10

20

30

40

50

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、血液製剤サンプルの品質を評価する方法であって、前記サンプル中で本発明の少なくとも1つのマーカーパネルのマーカーの値を決定するステップ、決定した値を対応する参照値と比較するステップ、および前記血液製剤サンプルの品質を評価するステップを含む、方法に関する。本発明はさらに、血液製剤サンプルの品質を評価するためのデバイスおよびキット、ならびに少なくとも、本発明の少なくとも1つのマーカーパネルのマーカーの特性値を含むデータコレクションおよび前記データコレクションを含むデータ保存媒体に関する。さらに、本発明は、血液製剤サンプルの品質を評価する方法のステップを含む、十分な品質の血液製剤のコレクションを提供する方法に関する。

10

## 【背景技術】

## 【0002】

任意の生物医学的研究のためまたは治療的および/もしくは診断的目的のためにバイオバンクに保存された生物学的材料の価値が、サンプル組成を妨害する分析前交絡因子により損なわれ得るという事実は、十分に報告されている(Aguilar-Mahechaら(2012), PLoS ONE 7(6) : e38290 ; Ahmed, FE (2011), Analytical Methods 3 : 1029 ; Baechlerら(2004), Genes and Immunity 5 : 3473) ; Becker & Lockwood (2013), Clinical Biochemistry 46 : 861 ; Messaoudiら(2013), Clinica Chimica Acta 424 : 222 ; Greystokeら (2008), Annals of Oncology 19 : 990 ; Hebelら(2013), Environmental Health Perspectives 121(4) : 480 ; Kamlageら(2014) ; Clinical Chemistry 60 : 2 : 399 ; Odozzeら (2012), Clinica I Biochemistry 45 : 464 ; Rai & Vitzthum (2006), Expert Rev Proteomics 3(4) : 409 ; Tuckら (2009) J Proteome Res. 8(1) : 113 ; Vaughtら (2011), J Natl Cancer Inst Monogr 42 : 1 ; Yangら、Anal. Chem. 85, 2606 ; Yinら (2013), Clinical Chemistry 59(5) : 833)。例えば、代謝産物プロファイリングにおいて使用されるサンプルにおいて、バイオマーカーの同定および確認の可能性は、サンプルメタボロームを妨害する分析前交絡因子によって損なわれ、不均衡なシステムティックバイアス、変動性の増加、不安定な効果および再現不可能な結果をもたらし得る。従って、代謝産物プロファイリングまたは他の分析的もしくは診断的方法のための品質および適合性を保証するために生物学的材料の品質を評価することが決定的に重要である。具体的には、関連の交絡因子は、血液、血漿または血清サンプルの処理および保存の時間および温度の増加、遠心分離プロトコル、凍結プロトコル、および他の分析前ステップの影響である。

20

## 【0003】

バイオバンキングには、品質保証および品質管理のための様々な基準、例えばISO 9001、ISOガイド34、ISO 17025および他の基準(例えば、Carter 2011, Biopreservation and Biobanking 9(2) : 157-163 ; Elliott 2008, Int J Epidemiology 37 : 234-244を参照)が存在する。生物学的材料の品質を評価するため、現在は、生化学的基準パラメータ(例えば、核酸含有量および完全性、凝固活性の存在、または細胞組成、細胞完全性およびサンプル中の細胞数)が決定される。しかし、このような基準パラメータの評価は、サンプルの全ての用途に適したものではなく、費用集約的であり得る。

30

## 【0004】

プロテオーム解析のためのサンプルの品質を保証するタンパク質バイオマーカーの報告が存在する(例えば、WO2012/170669を参照)。さらに、インキュベーションが血漿および血清サンプルのメタボロミック組成に影響を及ぼすことが報告された(Liuら 2010, Anal Biochem 406 : 105-115 ; Fliniauxら 2011, Journal of Biomolecular NMR 51(4) : 457-465 ; Boyanton 2002, Clinical Chemistry 48(12) : 2242-2247 ; Berniniら 2011, Journal of Biomolecular NMR 49 : 231-243)。

40

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

## 【0005】

## 【特許文献1】WO2012/170669

50

## 【非特許文献】

## 【0006】

- 【非特許文献1】Aguilar-Mahechaら(2012), PLoS ONE 7(6) : e38290
- 【非特許文献2】Ahmed, FE (2011), Analytical Methods 3 : 1029
- 【非特許文献3】Baechlerら (2004), Genes and Immunity 5 : 3473)
- 【非特許文献4】Becker & Lockwood (2013), Clinical Biochemistry 46 : 861
- 【非特許文献5】Messaoudiら (2013), Clinica Chimica Acta 424 : 222
- 【非特許文献6】Greystokeら (2008), Annals of Oncology 19 : 990
- 【非特許文献7】Hebelsら (2013), Environmental Health Perspectives 121(4) : 480
- 【非特許文献8】Kamlageら (2014) ; Clinical Chemistry 60 : 2 : 399
- 【非特許文献9】Odozzeら (2012), Clinical Biochemistry 45 : 464
- 【非特許文献10】Rai & Vitzthum (2006), Expert Rev Proteomics 3(4) : 409
- 【非特許文献11】Tuckら (2009) J Proteome Res. 8(1) : 113
- 【非特許文献12】Vaughtら (2011), J Natl Cancer Inst Monogr 42 : 1
- 【非特許文献13】Yangら Anal. Chem. 85, 2606
- 【非特許文献14】Yinら (2013), Clinical Chemistry 59(5) : 833
- 【非特許文献15】Carter 2011, Biopreservation and Biobanking 9(2) : 157-163
- 【非特許文献16】Elliott 2008, Int J Epidemiology 37 : 234-244
- 【非特許文献17】Liuら 2010, Anal Biochem 406 : 105-115
- 【非特許文献18】Fliniauxら 2011, Journal of Biomolecular NMR 51(4) : 457-465
- 【非特許文献19】Boyanton 2002, Clinical Chemistry 48(12) : 2242-2247
- 【非特許文献20】Berninieら 2011, Journal of Biomolecular NMR 49 : 231-243

10

20

30

40

50

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0007】

しかし、生物学的材料の品質を評価するための基準は未だに利用可能ではないが、それでもなお非常に望ましい。

## 【0008】

本発明の根底にある技術的課題は、前述のニーズを満たすための手段および方法の提供として理解することができる。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0009】

技術的課題は、特許請求の範囲および本明細書中以下において特徴づけられる実施形態によって解決される。

## 【0010】

従って、本発明は、血液製剤サンプルの品質を評価する方法であって、以下のステップ：

- 前記サンプル中で、表1の少なくとも1つのパネルのマーカーの値を決定するステップ；
- ステップa)で決定した値を対応する参照値と比較するステップ、および
- 前記血液製剤サンプルの品質を評価するステップ

を含む、上記方法に関する。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0011】

本発明の方法は、好ましくはin vitro方法であり；従って、本方法は、好ましくはex vivoで実施される(すなわちヒトまたは動物の身体には実施されない)方法である。さらに、本発明の方法は、上記で明示的に言及したステップの他にもステップを含み得る。例えば、さらなるステップは、例えばステップa)については2つ以上のバイオマーカーのサンプル内比を計算するステップに関連する場合もあれば、ステップc)の前もしくはステップc)において品質の付加的な指標を得るステップに関連する場合もある。本発明の方法は、

好ましくは自動化によって支援される。例えば、サンプル処理または前処理は、ロボット工学によって自動化することができる。データの処理および比較は、好ましくは、適切なコンピュータープログラムおよびデータベースによって支援される。本明細書中先に記載した自動化により、ハイスループットアプローチにおいて本発明の方法を使用することが可能となる。好ましくは、血液製剤サンプルの品質を評価する方法は、前記少なくとも1つのパネルの少なくとも1つの、好ましくは全てのマーカーの外部標準および/または内部標準を決定するステップをさらに含む。用語「外部標準」および「内部標準」は当業者に公知である。

#### 【0012】

好ましい実施形態において、本発明の方法は、以下のステップ：i) 前記血液製剤サンプルを本発明の少なくとも1つのバイオマーカーと特異的に相互作用する薬剤と接触させ、前記バイオマーカーと、前記バイオマーカーと特異的に相互作用する前記薬剤との間に形成された複合体の量を決定するステップ；ii) 前記血液製剤サンプルを、本発明の前記少なくとも1つのバイオマーカーと特異的に反応する酵素と接触させ、前記酵素によって前記バイオマーカーから形成された生成物の量を決定するステップ；iii) 前記血液製剤サンプルを少なくとも1つのバイオマーカーの化学的構造を改変する薬剤と接触させて好ましくは前記バイオマーカーの非天然誘導体を形成し、前記誘導体を検出するステップ；iv) 不十分な品質が評価される場合には前記血液製剤サンプルを廃棄するステップ、およびv) 不十分な品質が評価される場合には前記血液製剤サンプルをさらなる使用から除外するステップ、の1つ以上を付加的に含む。

10

20

30

40

50

#### 【0013】

本明細書中で使用される用語「品質」は、意図される使用のために使用可能であるか、または使用可能ではない本発明のサンプルの特性に関する。本発明のサンプルの意図される使用は当業者に公知であり、サンプルの任意の診断的、治療的、非診断的、または非治療的使用を包含する。好ましくは、意図される使用は非治療的使用であり；より好ましくは、意図される使用は、非治療的使用および非診断的使用である。好ましくは、意図される使用は *in vitro* 使用である。より好ましくは、意図される使用は、分析的および/または実験的使用である。本発明のサンプルの好ましい分析的および/または実験的使用は、ゲノム分析、トランスクリプトーム分析、またはプロテオミクス分析における使用である。本発明のサンプルのより好ましい分析的および/または実験的使用は、フードミクス分析またはリビドミクス分析における使用である。本発明のサンプルの最も好ましい分析的および/または実験的使用は、メタボロミクスにおける使用および/または少なくとも1つの臨床的に関連するパラメータの決定における使用であり、好ましくは、例えば臨床化学、薬物動態学的研究、薬力学的研究、および/または分子診断などが挙げられる。好ましい実施形態において、意図される使用は、プロテオミクス分析における使用である。

#### 【0014】

従って、用語「十分な品質」は、サンプル処理による変動を受けていない測定値を提供する(すなわち、好ましくは、代謝産物または意図される使用に関連する代謝産物を、本質的に新たに採血されたサンプル中に見られる濃度で含む)本発明のサンプルの特性に関する。より好ましくは、十分な品質は、代謝産物または意図される使用に関連する代謝産物を、本質的に標準プロトコルに従って処理されたサンプル中に見られる濃度で含む特性である。十分な品質のサンプルは、好ましくは組成物が代謝産物の量ならびに代謝産物の化学的性質に関して変化しないため、正確な分析を可能とする。好ましくは、血液製剤サンプル処理のための標準プロトコルは、室温における血液サンプルの採血；血液細胞を除去するための18 ~ 22 の制御温度の遠心分離機における60分以内の(好ましくは10分 ~ 15分の)前記血液サンプルの遠心分離；遠心分離の上清(血漿)の新たな容器への移行および最大 - 80 の温度における最大1年間の前記血漿の保存を含む。さらにより好ましくは、十分な品質は、交絡因子である(i) 静脈切開(血液の採血)と血液細胞からの血漿の分離との間の長時間、(ii) 静脈切開と血液細胞からの血漿の分離との間の不適当な温度、(iii) 血漿の長時間の保存、および(iv) 血漿の保存中の増加温度のいずれかによって引き起こ

される変化により影響を受けていない本発明のサンプルの特性に関する。異なるクラスの代謝産物、およびまたこれらのクラスの1つの中の異なるメンバーは、時間および温度によるそれらのサンプル内での変化の傾向が異なるということは当業者に理解される。例えば、タンパク質は、一般的にはRNAより安定しており；IgGのようなタンパク質は、一般的には、ペプチドホルモンまたはサイトカインよりも安定している。

【0015】

当業者により理解されるとおり、血液血小板は冷却によって活性化され、この活性化がこれらのサンプルに由来する対応する血漿のメタボロームおよびプロテオームならびに他の生体分子を変化させるため、血液は冷却に対して感受性である。従って、意図される適用に応じて、血液の冷却は不利になる可能性があり、血液処理温度の規定は、例えば多施設研究において、研究群における不均衡を回避するために重要である。血液細胞が血漿から除去されるとすぐに、冷却は、サンプルに及ぼされる酵素的および/または化学的な酸化的分析前影響を最小化するために有利である。好ましいサンプル調製プロトコルは当技術分野において公知であり、例えば、本明細書中上記に引用される参考文献中に記載されており、例えば、プロテオミクスについてはRai & Vitzthum(上記引用箇所)中に概説されるプロトコルなどが挙げられる。上記から、好ましくは、標準プロトコルが意図される使用に応じて変動し得ることが理解される。

【0016】

好ましい実施形態において、意図される使用は、メタボロミクスにおけるおよび/または少なくとも1つのバイオマーカーの決定における本発明のサンプルの使用であり、十分な品質は、メタボロミック組成の正確な分析を可能とするサンプルの組成に関する。より好ましい実施形態において、意図される使用は、メタボロミクスにおけるおよび/または少なくとも1つのバイオマーカーの決定における本発明のサンプルの使用であり、十分な品質は、交絡因子である(i) 60分超の静脈切開と血液細胞の除去の開始との間の時間、(ii) 静脈切開と血液細胞の除去の開始との間または血液細胞の除去中の不適当な温度、(iii) 5超の温度における30分超の血漿の保存、および(iv) -80以上の温度における1年超の血漿の保存、のいずれか1つによって引き起こされる変化により影響を受けていない本発明のサンプルの特性に関する。血漿の保存については、Arrhenius式の近似式を他の保存温度および保存時間に適用する。

【0017】

逆に、用語「不十分な品質」は、サンプル処理による変動を受けた測定値を提供する(すなわち、好ましくは、代謝産物または意図される使用に関連する代謝産物を本質的に新たに採血されたサンプル中に見られる濃度で含まない)本発明のサンプルの特性に関する。より好ましくは、不十分な品質は、代謝産物または意図される使用に関連する代謝産物を、本明細書中上記の標準プロトコルに従って処理されたサンプル中に見られる濃度から逸脱する、好ましくは著しく逸脱する濃度で含む特性である。不十分な品質のサンプルは、代謝産物の量ならびに代謝産物の化学的性質に関して、代謝組成が変化するため、不正確な分析の原因となる可能性がある。不十分な品質は、好ましくは、代謝産物の分解および/または前記代謝産物の化学的変質によって引き起こされる可能性がある。さらにより好ましくは、不十分な品質は、交絡因子である(i) 静脈切開と血液細胞からの血漿の分離との間の長時間、(ii) 静脈切開と血液細胞からの血漿の分離との間の不適当な温度、(iii) 血漿の長時間の保存、および(iv) 血漿の保存中の増加温度の少なくとも1つによって引き起こされる変化により影響を受けている本発明のサンプルの特性に関する。好ましい実施形態において、意図される使用は、メタボロミクスにおけるおよび/または少なくとも1つのバイオマーカーの決定における本発明のサンプルの使用であり、不十分な品質は、メタボロミック組成の正確な分析を可能としないサンプルの組成に関する。より好ましい実施形態において、意図される使用は、メタボロミクスにおけるおよび/または少なくとも1つのバイオマーカーの決定における本発明のサンプルの使用であり、不十分な品質は、交絡因子である(i) 60分超の静脈切開と血液細胞の除去の開始との間の時間、(ii) 静脈切開と血液細胞の除去の開始との間または血液細胞の除去中の不適当な温度、(iii)

10

20

30

40

50

5 超の温度における30分超の血漿の保存、および(iv) -80 以上の温度における1年超の血漿の保存、の少なくとも1つによって引き起こされる変化により影響を受けている本発明のサンプルの特性に関する。

【0018】

本明細書中で使用される用語「評価する」は、血液製剤サンプルの不十分な品質と十分な品質とを識別することに関する。好ましくは、「評価する」は、本明細書中他の箇所に記載される交絡因子のいずれかがサンプルに影響を及ぼすことを排除することに関し、すなわち、好ましくは、「評価する」は、サンプルを意図される使用に許容可能である(すなわち十分な品質を有する)か、または許容不可能である(すなわち不十分な品質を有する)かを分類することに関する。さらに好ましい実施形態において、「評価する」は、サンプルが血液処理に関連する交絡因子(すなわち、好ましくは、静脈切開と血液細胞からの血漿の分離との間の長時間、または静脈切開と血液細胞からの血漿の分離との間の増加温度)により影響を受けたか否か、あるいは前記サンプルが血漿処理および/または保存に関連する交絡因子(すなわち、好ましくは血漿の長時間の保存または血漿の保存中の増加温度)により影響を受けたか否かを識別することをさらに含む。当業者によって理解されるとおり、このような評価は、好ましくはあるが、通常は、研究されたサンプルの100%について正確ではない可能性がある。しかし、上記用語は、サンプルの統計的に有意な部分を正確に評価し得ることを必要とする。ある部分が統計的に有意であるか否かは、様々な周知の統計的評価ツール(例えば、信頼区間の決定、p値決定、Studentのt-検定、Mann-Whitney検定等)を用いて、当業者がさらなる苦労なく決定することができる。詳細は、Dowd 10 yおよびWearden, Statistics for Research, John Wiley & Sons, New York 1983中に見出だされる。好ましい信頼区間は、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%または少なくとも95%である。p値は、好ましくは、0.2、0.1、または0.05である。

【0019】

好ましくは、「評価する」は、3つ以上の品質クラス(例えば、高品質、中品質および低品質の3つの品質クラス)に従ってサンプルを分類することを包含する。より好ましくは、本明細書中に記載される方法のいずれかによるサンプルの分類は、各サンプルに適用される処理条件についてのより正確な推定も包含し(またはもたらし)得る; 例えば、好ましくは、血液処理関連交絡因子に関しては、「高品質」は、採血後2時間以内のサンプルの遠心分離として記載することが可能であり; 「中品質」は、採血後2~6時間以内のサンプルの遠心分離として記載することが可能であり; 「低品質」は、採血の6時間超後のサンプルの遠心分離、またはサンプルに及ぼされる血小板活性化の影響として記載することができる。血漿処理関連交絡因子に関しては、「高品質」は、遠心分離および実験室ベンチ処理時間後室温における6時間以下の時間内のサンプルの処理として記載することができる; 「中品質」は、遠心分離後6~24時間の時間内のサンプルの処理として記載することができる; 「低品質」は、遠心分離後24時間超の時間内のサンプルの処理として記載することができる。好ましくは、サンプルの分類は、本明細書中以下に特定されるとおりに品質スコアを決定することを含む。

【0020】

好ましくは、サンプルの数値的品質評価(品質スコア)が所望される場合、パネルのマーカーの値は、所定のカットオフ値に対する比較によって分類され、好ましくは単一値にまとめられ、その後、この単一値が、例えば1~100にスケール化される。

【0021】

より好ましくは、代謝産物は、それらの重要性により重みづけされる。

【0022】

最も好ましくは、パネルのマーカーの個々の数値は、多変量モデル、例えばロジスティック回帰モデルを用いることにより、組み合わせ値に変換される。

【0023】

さらに、上記に示されるとおり、数値的品質評価(品質スコア)は、好ましくは、(i)血

10

20

30

40

50

液処理関連交絡因子(採血(静脈切開)と、例えば採血管の遠心分離による、細胞からの血漿の分離との間の時間および温度)について、および(ii) 血漿処理関連交絡因子(凍結または液体の血液血漿の短期および長期保存の時間および温度)について、別々に計算される。血液または血漿処理のいずれかに関連する交絡因子へのマーカーの割り当ては、好ましくは表3に従って行われる。

#### 【0024】

本明細書中で使用される用語「マーカー」は、本明細書中で言及される品質の指標としての役割を果たす任意の化学的または数学的実体に関する。好ましくは、マーカーは、本明細書中以下に特定されるバイオマーカー(すなわち、好ましくは、前記バイオマーカーの存在または不存在)であり；より好ましくは、マーカーは、サンプル中のバイオマーカーの絶対濃度、もしくは好ましくは相対濃度であるか、または任意の標準的な数学的計算においてそこから誘導される値である。従って、マーカーは、好ましくは、本発明の少なくとも2つのバイオマーカーの濃度のサンプル内比である。

10

#### 【0025】

用語「マーカーパネル」および「パネル」は、本発明の表1および2の1つにおいてパネルとして同定される特定のマーカーの組み合わせの1つに関する。好ましくは、パネルは少なくとも3つのマーカーを含み、このうち少なくとも1つのマーカーは、血液処理に関連する交絡因子に関連する不十分な品質を示すのに適しており、またこのうち少なくとも第2のマーカーは、血漿処理に関連する交絡因子に関連する不十分な品質を示すのに適している。

20

#### 【0026】

本明細書中で使用される用語「バイオマーカー」は、本明細書中で言及される品質の指標としての役割を果たす化学的分子を指す。好ましくは、前記化学的分子は、被験体のサンプル中に見られる代謝産物自体である。さらに、上記バイオマーカーは、前記代謝産物に由来する分子種であってもよい。このような場合、実際の代謝産物は、サンプル中でまたは決定プロセス中に化学的に改変され、前記改変の結果、化学的に異なる分子種(すなわち分析物)は、決定される分子種となる。このような場合、分析物が実際の代謝産物を表し、品質の指標と同じ可能性を有することが理解される。さらに、本発明によるバイオマーカーは、必ずしも1つの分子種に対応しない。むしろ、バイオマーカーは、化合物の立体異性体またはエナンチオマーを含み得る。従って、例えば、バイオマーカーであるグリセロール-3-リン酸は、好ましくはその立体異性体のグリセロール-1-リン酸を包含する。さらに、バイオマーカーは、異性体分子の生物学的クラスの異性体の合計も表し得る。前記異性体は、好ましくは、同一の分析的特徴を示す場合があり、また従って、添付の以下に記載される実施例において適用される分析方法を含む様々な分析方法によって識別することが不可能である。しかし、上記異性体は、少なくとも同一の加法定理(sum formula)パラメータを共有し、また従って、例えば脂質の場合、脂肪酸における同一鎖長および同一二重結合数および/またはスフィンゴ塩基部分を共有する。極性バイオマーカーは、好ましくは、本明細書中他の箇所で言及され、以下の実施例に記載される技術によって得ることができる。脂質バイオマーカーは、本発明に従って、好ましくは本明細書中他の箇所に記載されるとおりに得ることが可能であり、特に、例えば、以下の実施例に記載されるエタノールとジクロロメタンとの混合物による、水性極性相および有機脂質相へのタンパク質沈殿後のサンプルの分離によって脂質画分として得ることができる。代替的にまたは付加的に、固相抽出法(SPE)を用いてバイオマーカーをサンプルから濃縮することができる。同様に本発明のバイオマーカーとして包含されるのは、サンプルに少なくとも部分的に外部から添加された化学的化合物(例えばエチレンジアミン四酢酸(EDTA)またはシトレート(citrate))の存在もしくは不存在または、好ましくは濃度、あるいはその数学的に誘導された値である。

30

#### 【0027】

本明細書中で使用される用語「マトリックスチェック」は、抗凝固剤のタイプまたはその不存在を確認することに関する。好ましくは、マトリックスチェックは、サンプルが抗

40

50

凝固剤としてEDTA、シトレート、またはヘパリンを含むか否か、または抗凝固剤を含まないかどうかを決定する。より好ましくは、マトリックスチェックは、サンプルタイプが、EDTA血漿サンプル、シトレート血漿サンプル、ヘパリン血漿サンプルまたは血清サンプルであるか否かを確認する。従って、好ましくは、マトリックスチェックは、サンプル中に存在する抗凝固剤が、前記サンプル中に存在することが意図される抗凝固剤と一致していることを確認する。

【0028】

本明細書中で使用される用語「代謝産物」は、特定の代謝産物の少なくとも1つの分子から前記特定の代謝産物の複数の分子までに関する。「代謝産物の群」が、複数の化学的に異なる分子を意味し、各代謝産物について少なくとも1つの分子から複数の分子まで存在し得ることがさらに理解される。本発明による代謝産物は、全てのクラスの有機または無機化学的化合物を包含し、例えば、生物学的材料(例えば生物)に含まれる有機または無機化学的化合物などが挙げられる。従って、好ましくは、「代謝産物」は、生物学的高分子(例えば、好ましくは、DNA、RNA、タンパク質、またはそれらの断片)である。より好ましくは、本発明による代謝産物は小分子化合物である。より好ましくは、複数の代謝産物が想定される場合、前記複数の代謝産物がメタボローム(すなわち特定の時間に特定の条件下で生物、器官、組織、体液または細胞に含まれている代謝産物のコレクション)を表す。本明細書中で列挙される特定のバイオマーカーに加えて、他のバイオマーカーおよび/または指標も、好ましくは本発明の方法において決定することができる。このようなバイオマーカーとして、例えば、ペプチドバイオマーカーまたはポリペプチドバイオマーカー(例えば、WO2012/170669、Liuら 2010, Anal Biochem 406 : 105-115、またはFliniauxら 2011, Journal of Biomolecular NMR 51(4) : 457-465において言及されるペプチドバイオマーカーまたはポリペプチドバイオマーカー)などを挙げることができる。

10

20

30

40

50

【0029】

本発明による方法において、少なくとも、表1の少なくとも1つのパネルのマーカーの値が決定される。好ましい実施形態において、少なくともパネル3\_a、13\_a、15\_a、16\_a、1\_a、1\_b、10\_a、11\_a、12\_a、13\_b、14\_a、14\_b、17\_b、18\_b、19\_a、19\_b、2\_b、20\_b、3\_b、4\_a、5\_a、5\_b、6\_a、7\_a、7\_b、8\_b、1、2、3、4、5、6、7、8、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、3\_m、6\_m、10\_m、15\_m、16\_m、17\_m、18\_m、19\_m、または20\_mのマーカーの値が少なくとも決定される。

【0030】

好ましくは、少なくとも、表1のパネル2\_bのマーカーが決定され、このマーカーを、好ましくは酵素的によって決定することができるか；または少なくとも、表1のパネル4\_aのマーカーが決定され、このマーカーを、好ましくはSPEとLCおよび質量分析との組み合わせによって(特にSPE-LC-MS/MS法により)、エイコサノイドに焦点を当てて分析することができるか；または少なくとも、表1のパネル5\_aもしくは5\_bのマーカーが決定され、このマーカーを、好ましくは脂質画分からLCと質量分析との組み合わせによって(特にLC-MS/MSにより)分析することができるか；または少なくとも、表1のパネル6\_aのマーカーが決定され、このマーカーを、好ましくは極性画分からLCと質量分析との組み合わせによって(特にLC-MS/MSにより)分析することができるか；または少なくとも、表1のパネル7aもしくは7bのマーカー(特にパネル7\_aのマーカー)が決定され、このマーカーを、好ましくはSPEとLCおよび質量分析との組み合わせによって(特にSPE-UPLC-MS/MS法により)、スフィンゴイドに焦点を当てて分析することができるか；または少なくとも、表1のパネル12\_aのマーカーが決定され、このマーカーを、好ましくは脂質画分から分析することができるか；または血液血漿(凍結または液体)の短期保存および長期保存の時間および温度に関連する交絡因子に焦点を当てて、少なくとも、表1のパネル14\_aもしくは14\_bのマーカーが決定されるか；または、好ましくは、少なくとも、表1のパネル1\_a、10\_a、11\_a、13\_a、13\_b、15\_a、16\_a、18\_b、19\_a、19\_b、20\_b、3\_a、または3\_bのマーカーが決定され、このマーカーを、好ましくは極性画分からGCおよび質量分析の組み合わせによって(特にGC-MSにより)分析することができるか；または、好ましくは、少なくとも、表1のパネル1\_

a、10\_a、11\_a、13\_a、13\_b、15\_a、16\_a、18\_b、19\_a、19\_b、20\_b、3\_a、または3\_bのマーカーが決定され、このマーカーを、好ましくは極性画分からLCおよび質量分析の組み合わせによって(特にLC-MS/MSにより)分析することができる。最も好ましくは、少なくとも、表1のパネル3\_a、3\_b、10\_a、11\_a、13\_a、13\_b、15\_a、16\_a、17\_b、18\_b、19\_a、19\_b、または20\_bの少なくとも1つのマーカーの値が、本発明の方法において決定される。

【0031】

【表1】

表1: 本発明のマーカーパネル; パネル番号、それに含まれるマーカー、および不十分な品質を示す変化の方向が示される。

パネル番号	マーカー	方向
3_a	オルニチン	上昇
	グリセロール-3-リン酸	上昇
	グリセレート	上昇
13_a	グリセロール-3-リン酸	上昇
	グリセレート	上昇
	ヒポキサンチン	上昇
15_a	オルニチン	上昇
	グリセロール-3-リン酸	上昇
	ヒポキサンチン	上昇
16_a	オルニチン	上昇
	グリセレート	上昇
	ヒポキサンチン	上昇
1_a	オルニチン	上昇
	アルギニン	下降
	ヒポキサンチン	上昇
1_b	オルニチン	上昇
	アルギニン	下降
	ヒポキサンチン	上昇
10_a	スフィンガジエニン-1-リン酸 (d18:2)	上昇
	オルニチン	上昇
	グリセロール-3-リン酸	上昇
	グリセレート	上昇
11_a	ヒポキサンチン	上昇
	グルタメート/グルタミン サンプル内比	上昇
	グリセレート	上昇
12_a	コレステリルエステルヒドロペルオキシド(C18:2-9-OOH)	上昇
	スフィンゴシン (d18:1)	下降
	スフィンゴシン-1-リン酸 (d18:1)	上昇
13_b	グルタミン	下降
	グルタメート	上昇
	ヒポキサンチン	上昇
14_a	グリセロール-3-リン酸	上昇
	グリセレート	上昇
	グルタメート/グルタミン サンプル内比	上昇
14_b	3-ホスホグリセレート (3-PGA)	上昇
	3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸 (DOPAC)	下降
	3,4-ジヒドロキシフェニルグリコール (DOPEG)	下降
17_b	オルニチン	上昇
	ヒポキサンチン	上昇
	3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸 (DOPAC)	下降
	グルタメート/グルタミン サンプル内比	上昇

10

20

30

40

18_b	アルギニン	下降	10
	グリセロール-3-リン酸	上昇	
	トレオニン酸	上昇	
	ヒポキサンチン	上昇	
19_a	グリセロール-3-リン酸	上昇	20
	グリセレート	上昇	
	ヒポキサンチン	上昇	
	オルニチン/アルギニン サンプル内比	上昇	
19_b	グリセレート	上昇	30
	グルタメート/グルタミン サンプル内比	上昇	
	オルニチン/アルギニン サンプル内比	上昇	
2_b	グルタミン	下降	30
	グリセロール-3-リン酸	上昇	
	グルタメート	上昇	
	ヒポキサンチン	上昇	
20_b	グリセロール-3-リン酸	上昇	30
	トレオニン酸	上昇	
	グルタメート/グルタミン サンプル内比	上昇	
3_b	オルニチン	上昇	30
	ヒポキサンチン	上昇	
	グルタメート/グルタミン サンプル内比	上昇	
4_a	15-ヒドロキシエイコサテトラエン酸 (C20:シス[5,8,11,13]4)	上昇	40
	5-ヒドロキシエイコサテトラエン酸 (C20:トランス[6]シス[8,11,14]4) (5-HETE)	上昇	
	12-ヒドロキシエイコサテトラエン酸 (C20:シス[5,8,10,14]4)	下降	
5_a	ホスファチジルコリンヒドロペルオキシド (C18:0,C18:2-OOH)	上昇	40
	トリアシルグリセリドヒドロペルオキシド (C16:0,C18:1,C18:3-OOH)	上昇	
	コレステリルエステルヒドロペルオキシド(C18:2-9-OOH)	上昇	
5_b	リソホスファチジルコリン (C18:1)	上昇	40
	ホスファチジルコリンヒドロペルオキシド (C18:0,C18:2-OOH)	上昇	
	コレステリルエステルヒドロペルオキシド(C18:2-9-OOH)	上昇	
6_a	アルギニン	下降	40
	グリセロール-3-リン酸	上昇	
	グルタメート/グルタミン サンプル内比	上昇	
7_a	スフィンゴシン (d16:1)	下降	40
	スフィンガジエニン (d18:2)	下降	
	スフィンゴシン-1-リン酸 (d16:1)	上昇	
	スフィンガジエニン-1-リン酸 (d18:2)	上昇	
7_b	スフィンガジエニン (d18:2)	下降	40
	スフィンゴシン (d18:1)	下降	
	スフィンガジエニン-1-リン酸 (d18:2)	上昇	
	スフィンゴシン-1-リン酸 (d18:1)	上昇	
8_b	グリセレート	上昇	40
	ホスファチジルコリンヒドロペルオキシド (C16:0,C18:1-OOH)	上昇	
	コレステリルエステルヒドロペルオキシド(C18:2-13-OOH)	上昇	

## 【 0 0 3 2 】

より好ましくは、本発明の方法において、少なくとも、バイオマーカーである(i) グリセロール-3-リン酸、グリセレート(glycerate)、およびオルニチン；(ii) グリセロール-

3-リン酸、グリセレート、およびヒポキサンチン；(iii) グリセロール-3-リン酸、オルニチン、およびヒポキサンチン；または(iv) グリセレート、オルニチン、およびヒポキサンチンの量が決定される。バイオマーカーの量を決定するステップの後、それからさらなるマーカーの値を計算するステップが続き得ること；例えば、好ましくは、決定されたオルニチンの量を用いて、マーカーとしてのオルニチン/アルギニンのサンプル内比を計算し得ることが当業者に理解される。

#### 【0033】

さらにより好ましくは、少なくとも、表2の少なくとも1つのパネルのマーカーの値が少なくとも決定される。表1のパネルは、表2に示されるパネルのサブパネルであり；サブパネルのナンバリング付は、それが由来する表2のパネルを示す。従って、サブパネルX\_aおよび/またはX\_b(X=1、2、3、4、5、6、7、8、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20)は、表2におけるパネルXに由来する。しかし、サブパネルが、表2のさらなるパネルにも含まれるマーカーを含み得ることが理解される。

10

#### 【0034】

好ましくは、静脈切開と細胞からの血漿の分離との間の時間および温度に関連する交絡因子に焦点を当てて、少なくとも、表2のパネル1のマーカーが決定されるか；または、少なくとも、表2のパネル2のマーカーが決定され、このマーカーを、好ましくは酵素的 20方法によって決定することができるか；または少なくとも、表2のパネル4のマーカーが決定され、このマーカーを、好ましくはSPEとLCおよび質量分析との組み合わせによって(特にSPE-E-LC-MS/MS法により)、エイコサノイドに焦点を当てて分析することができるか；または少なくとも、表2のパネル5のマーカーが決定され、このマーカーを、好ましくは脂質画分からLCと質量分析との組み合わせによって(特にLC-MS/MSにより)分析することができるか；または少なくとも、表2のパネル6のマーカーが決定され、このマーカーを、好ましくは極性画分からLCと質量分析との組み合わせによって(特にLC-MS/MSにより)分析することができるか；または少なくとも、表2のパネル7のマーカーが決定され、このマーカーを好ましくはSPEとLCおよび質量分析との組み合わせによって(特にSPE-UPLC-MS/MS法により)、スフィンゴイドに焦点を当てて分析することができるか；または凍結血液血漿の長期保存の時間および温度に関連する交絡因子に焦点を当てて、少なくとも、表2のパネル8のマーカーが決定されるか；または少なくとも、表2のパネル12のマーカーが決定され、このマーカーを、好ましくは脂質画分から分析することができるか；または血液血漿(凍結または液体)の短期保存および長期保存の時間および温度に関連する交絡因子に焦点を当てて、少なくとも、表2のパネル14のマーカーが決定されるか、または、好ましくは、少なくとも、表2のパネル3、15、16、18、19、または20のマーカーが決定され、このマーカーを、好ましくは極性画分からGCおよび質量分析の組み合わせによって(特にGC-MSにより)分析することができるか；または、好ましくは、少なくとも、表2のパネル3、15、16、18、19または20のマーカーが決定され、このマーカーを、好ましくは極性画分からLCおよび質量分析の組み合わせによって(特にLC-MS/MSにより)分析することができる。最も好ましくは、少なくとも、表2のパネル3、10、11、13、15、16、17、18、19、または20の少なくとも1つのマーカーの値が、本発明の方法において決定される。

20

#### 【0035】

30

40

【表2】

表2: さらに改良された本発明のマーカーパネル; パネル番号、それに含まれるマーカー、および不十分な品質を示す変化の方向が示される。

パネル番号	マーカー	方向
1	ヒポキサンチン	上昇
	オルニチン	上昇
	アルギニン	下降
	オルニチン/アルギニン サンプル内比	上昇
	リボース	上昇
	スフィンゴシン (d18:1)	下降
	スフィンゴシン-1-リン酸 (d18:1)	上昇
	グルコース	下降
	ラクテート	上昇
	スフィンゴシン (d16:1)	下降
	スフィンゴシン-1-リン酸 (d16:1)	上昇
	タウリン	下降
	12-ヒドロキシエイコサテトラエン酸 (C20:シス[5,8,10,14]4)	下降
	ラクテート/グルコース サンプル内比	上昇
	シトルリン	上昇
	12-ヒドロキシヘプタデカトリエン酸 (C17:[5,8,10]3)	下降
	13-ヒドロキシオクタデカジエン酸 (13-HODE) (C18:シス[9]トランス[11]2)	上昇
	5-ヒドロキシエイコサテトラエン酸 (C20:トランス[6]シス[8,11,14]4) (5-HETE)	上昇
	9-ヒドロキシオクタデカジエン酸 (9-HODE) (C18:トランス[10]シス[12]2)	上昇
2	グルコース-6-リン酸	上昇
	ペントース	上昇
	セロトニン (5-HT)	下降
	スフィンガジエニン (d18:2)	下降
	スフィンガジエニン-1-リン酸 (d18:2)	上昇
	スフィンゴシン-1-リン酸 (d17:1)	上昇
	トロンボキサン B2	下降
	グリセレート	上昇
	グリセロール-3-リン酸	上昇
	ヒポキサンチン	上昇
40	3-ホスホグリセレート (3-PGA)	上昇
	グルタメート	上昇
	グルタミン	下降
	オルニチン	上昇
	システイン	下降
	3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸 (DOPAC)	下降
	3,4-ジヒドロキシフェニルグリコール (DOPEG)	下降
	スフィンゴシン (d18:1)	下降
	スフィンゴシン-1-リン酸 (d18:1)	上昇
	コレステリルエステルヒドロペルオキシド (C18:2-9-OOH)	上昇

3	スフィンゴシン (d16:1)	下降	10
	スフィンゴシン-1-リン酸 (d16:1)	上昇	
	ホスファチジルコリンヒドロペルオキシド (C18:0,C18:2-OOH)	上昇	
	トリアシルグリセリドヒドロペルオキシド (C16:0,C18:1,C18:3-OOH)	上昇	
	グリセレート	上昇	
	グリセロール-3-リン酸	上昇	
	グルタメート/グルタミン サンプル内比	上昇	
	ヒポキサンチン	上昇	
	3-ホスホグリセレート (3-PGA)	上昇	
	グルタメート	上昇	
	グルタミン	下降	
	オルニチン	上昇	
	システイン	下降	
	トレオニン	上昇	
	アルギニン	下降	
	アスパラギン	下降	
	アスバルテート/アスパラギン サンプル内比	上昇	
	オルニチン/アルギニン サンプル内比	上昇	
4	リボース	上昇	20
	シスチン	下降	
	グルコース	下降	
	ラクテート	上昇	
	タウリン	下降	
	ラクテート/グルコース サンプル内比	上昇	
	シトルリン	上昇	
	マルトース	上昇	
	アラニン	上昇	
	マルトトリオース	上昇	
	尿酸	上昇	
	12-ヒドロキシエイコサテトラエン酸 (C20:シス[5,8,10,14]4)	下降	
	15-ヒドロキシエイコサテトラエン酸 (C20:シス[5,8,11,13]4)	上昇	
	12-ヒドロキシヘプタデカトリエン酸 (C17:[5,8,10]3)	上昇	
	13-ヒドロキシオクタデカジエン酸 (13-HODE) (C18:シス[9]トランス[11]2)	上昇	
4	5-ヒドロキシエイコサテトラエン酸 (C20:トランス[6]シス[8,11,14]4) (5-HETE)	上昇	30
	9-ヒドロキシオクタデカジエン酸 (9-HODE) (C18:トランス[10]シス[12]2)	上昇	
	トロンボキサン B2	上昇	
	11-ヒドロキシエイコサテトラエン酸 (C20:シス[5,8,12,14]4)	上昇	
	8,9-ジヒドロキシエイコサトリエン酸 (C20:シス[5,11,14]3)	上昇	
	8-ヒドロキシエイコサテトラエン酸 (C20:トランス[5]シス[9,11,14]4) (8-HETE)	上昇	
	プロスタグランジン D2	上昇	
	プロスタグランジン E2	上昇	

5	コレステリルエステルヒドロペルオキシド (C18:2-9-OOH)	上昇
	ホスファチジルコリンヒドロペルオキシド (C18:0,C18:2-OOH)	上昇
	トリアシルグリセリドヒドロペルオキシド (C16:0,C18:1,C18:3-OOH)	上昇
	コレステリルエステルヒドロペルオキシド (C20:4-OOH)	上昇
	リゾホスファチジルコリン (C18:0)	上昇
	ホスファチジルコリンヒドロペルオキシド (C16:0,C18:1-OOH)	上昇
	セラミド(d18:1,C24:0)	上昇
	コレステリルエステルヒドロペルオキシド (C18:2-13-OOH)	上昇
	リゾホスファチジルコリン (C17:0)	上昇
	リゾホスファチジルコリン (C18:1)	上昇
	リゾホスファチジルコリン (C20:4)	上昇
	ホスファチジルコリンヒドロペルオキシド (C16:0,C18:2-OOH)	上昇
	トリアシルグリセリドヒドロペルオキシド (C16:0,C18:1,C18:2-OOH)	上昇
	トリアシルグリセリドヒドロペルオキシド (C16:0,C18:1,C20:4-OOH)	上昇
6	トリアシルグリセリドヒドロペルオキシド (C16:0,C18:2,C18:2-OOH)	上昇
	トリアシルグリセリドヒドロペルオキシド (C18:1,18:2,C18:2-OOH)	上昇
	トリアシルグリセリドヒドロペルオキシド (C18:1,C18:1,C18:3-OOH)	上昇
	グリセロール-3-リン酸	上昇
	グルタメート/グルタミン サンプル内比	上昇
	グルタメート	上昇
	グルタミン	下降
	アルギニン	下降
	アスパラギン	下降
	アスパルテート/アスパラギン サンプル内比	上昇
7	グルコース-6-リン酸	上昇
	ペントース	上昇
	クレアチニン	上昇
	スフィンゴシン (d18:1)	下降
	スフィンゴシン-1-リン酸 (d18:1)	上昇
	スフィンゴシン (d16:1)	下降
	スフィンゴシン-1-リン酸 (d16:1)	上昇
8	スフィンガジエニン (d18:2)	下降
	スフィンガジエニン-1-リン酸 (d18:2)	上昇
	スフィンゴシン-1-リン酸 (d17:1)	上昇
	グリセレート	上昇
	グリセロール-3-リン酸	上昇
	グルタメート/グルタミン サンプル内比	上昇
	3-ホスホグリセレート (3-PGA)	上昇
	システイン	下降
	トレオニン酸	上昇
	3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸 (DOPAC)	下降

10

20

30

40

10	3,4-ジヒドロキシフェニルグリコール (DOPEG)	下降
	アスパルテート/アスパラギン サンプル内比	上昇
	コレステリルエステルヒドロペルオキシド (C18:2-9-OOH)	上昇
	シスチン	下降
	ホスファチジルコリンヒドロペルオキシド (C18:0,C18:2-OOH)	上昇
	トリアシルグリセリドヒドロペルオキシド (C16:0,C18:1,C18:3-OOH)	上昇
	コレステリルエステルヒドロペルオキシド (C20:4-OOH)	上昇
	リソホスファチジルコリン (C18:0)	上昇
	ホスファチジルコリンヒドロペルオキシド (C16:0,C18:1-OOH)	上昇
	コレステリルエステルヒドロペルオキシド (C18:2-13-OOH)	上昇
	ホスファチジルコリンヒドロペルオキシド (C16:0,C18:2-OOH)	上昇
	トリアシルグリセリドヒドロペルオキシド (C16:0,C18:1,C18:2-OOH)	上昇
	トリアシルグリセリドヒドロペルオキシド (C16:0,C18:1,C20:4-OOH)	上昇
	トリアシルグリセリドヒドロペルオキシド (C16:0,C18:2,C18:2-OOH)	上昇
	トリアシルグリセリドヒドロペルオキシド (C18:1,18:2,C18:2-OOH)	上昇
	トリアシルグリセリドヒドロペルオキシド (C18:1,C18:1,C18:3-OOH)	上昇
	グリセレート	上昇
	グリセロール-3-リン酸	上昇
	ヒポキサンチン	上昇
10	3-ホスホグリセレート (3-PGA)	上昇
	グルタメート	上昇
	グルタミン	下降
	オルニチン	上昇
	システイン	下降
	トレオノン酸	上昇
	3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸 (DOPAC)	下降
	アルギニン	下降
	3,4-ジヒドロキシフェニルグリコール (DOPEG)	下降
	アスパラギン	下降
11	リボース	上昇
	シスチン	下降
	グルコース	下降
	ラクテート	上昇
	タウリン	下降
	シトルリン	上昇
	マルトース	上昇
	グリセレート	上昇
	グルタメート/グルタミン サンプル内比	上昇
	ヒポキサンチン	上昇

10

20

30

40

12	グルタミン	下降	
	システイン	下降	
	3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸 (DOPAC)	下降	
	スフィンゴシン (d18:1)	下降	
	スフィンゴシン-1-リン酸 (d18:1)	上昇	
	コレステリルエステルヒドロペルオキシド (C18:2-9-OOH)	上昇	
	スフィンゴシン (d18:1)	下降	
	スフィンゴシン-1-リン酸 (d18:1)	上昇	
	コレステリルエステルヒドロペルオキシド (C18:2-9-OOH)	上昇	10
	スフィンゴシン (d16:1)	下降	
13	スフィンゴシン-1-リン酸 (d16:1)	上昇	
	12-ヒドロキシエイコサテトラエン酸 (C20:シス[5,8,10,14]4)	下降	
	ホスファチジルコリンヒドロペルオキシド (C18:0,C18:2-OOH)	上昇	
	トリアシルグリセリドヒドロペルオキシド (C16:0,C18:1,C18:3-OOH)	上昇	
	15-ヒドロキシエイコサテトラエン酸 (C20:シス[5,8,11,13]4)	上昇	
	グリセレート	上昇	
	グリセロール-3-リン酸	上昇	20
	ヒポキサンチン	上昇	
	3-ホスホグリセレート (3-PGA)	上昇	
	グルタメート	上昇	
14	グルタミン	下降	
	オルニチン	上昇	
	システイン	下降	
	3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸 (DOPAC)	下降	
	3,4-ジヒドロキシフェニルグリコール (DOPEG)	下降	
	グリセレート	上昇	
	グリセロール-3-リン酸	上昇	
	グルタメート/グルタミン サンプル内比	上昇	30
	3-ホスホグリセレート (3-PGA)	上昇	
	グルタメート	上昇	
14	グルタミン	下降	
	システイン	下降	
	トレオノ酸	上昇	
	3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸 (DOPAC)	下降	
	3,4-ジヒドロキシフェニルグリコール (DOPEG)	下降	
	アスバルテート/アスパラギン サンプル内比	上昇	
	シスチン	下降	
	リソホスファチジルコリン (C18:0)	上昇	
	3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン (DOPA)	下降	40
	アラニン	上昇	
14	セラミド(d18:1,C24:0)	上昇	
	リソホスファチジルコリン (C17:0)	上昇	
	リソホスファチジルコリン (C18:1)	上昇	
	リソホスファチジルコリン (C20:4)	上昇	
	アドレナリン (エピネフリン)	下降	

15	ノルアドレナリン (ノルエピネフリン)	下降
	グリセレート	上昇
	グリセロール-3-リン酸	上昇
	グルタメート/グルタミン サンプル内比	上昇
	ヒポキサンチン	上昇
	3-ホスホグリセレート (3-PGA)	上昇
	グルタメート	上昇
	グルタミン	下降
	オルニチン	上昇
	アルギニン	下降
	アスパラギン	下降
	オルニチン/アルギニン サンプル内比	上昇
	リボース	上昇
	グルコース	下降
	ラクテート	上昇
	タウリン	下降
16	グリセレート	上昇
	グリセロール-3-リン酸	上昇
	グルタメート/グルタミン サンプル内比	上昇
	ヒポキサンチン	上昇
	3-ホスホグリセレート (3-PGA)	上昇
	グルタメート	上昇
	グルタミン	下降
	オルニチン	上昇
	システイン	下降
	トレオニン	上昇
	アルギニン	下降
	アスパラギン	下降
	アスパルテート/アスパラギン サンプル内比	上昇
	オルニチン/アルギニン サンプル内比	上昇
	リボース	上昇
17	シスチン	下降
	グルコース	下降
	ラクテート	上昇
	タウリン	下降
	ラクテート/グルコース サンプル内比	上昇
	マルトース	上昇
	グリセレート	上昇
	グリセロール-3-リン酸	上昇
	グルタメート/グルタミン サンプル内比	上昇
	ヒポキサンチン	上昇
	3-ホスホグリセレート (3-PGA)	上昇
	グルタメート	上昇
	グルタミン	下降
	オルニチン	上昇
	3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸 (DOPAC)	下降
	3,4-ジヒドロキシフェニルグリコール (DOPEG)	下降
	アスパラギン	下降

10

20

30

40

10	アスパルテート/アスパラギン サンプル内比	上昇
	オルニチン/アルギニン サンプル内比	上昇
	リボース	上昇
	スフィンゴシン (d18:1)	下降
	スフィンゴシン-1-リン酸 (d18:1)	上昇
	スフィンゴシン (d16:1)	下降
	スフィンゴシン-1-リン酸 (d16:1)	上昇
	12-ヒドロキシエイコサテトラエン酸 (C20:シス[5,8,10,14]4)	下降
	ラクテート/グルコース サンプル内比	上昇
	15-ヒドロキシエイコサテトラエン酸 (C20:シス[5,8,11,13]4)	上昇
	コレステリルエステルヒドロペルオキシド (C20:4-OOH)	上昇
	ホスファチジルコリンヒドロペルオキシド (C16:0,C18:1-OOH)	上昇
	3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン (DOPA)	下降
	セロトニン (5-HT)	下降
20	グリセレート	上昇
	グリセロール-3-リン酸	上昇
	グルタメート/グルタミン サンプル内比	上昇
	ヒポキサンチン	上昇
	オルニチン	上昇
	トレオニン	上昇
	アルギニン	下降
30	グリセレート	上昇
	グリセロール-3-リン酸	上昇
	グルタメート/グルタミン サンプル内比	上昇
	ヒポキサンチン	上昇
	トレオニン	上昇
	オルニチン/アルギニン サンプル内比	上昇
30	グリセレート	上昇
	グリセロール-3-リン酸	上昇
	グルタメート/グルタミン サンプル内比	上昇
	ヒポキサンチン	上昇
	オルニチン	上昇
	トレオニン	上昇

## 【0036】

好ましい実施形態において、表1または2の少なくとも1つのパネルのマーカーに加えて、バイオマーカーであるアスパルテート(aspartate)、シトреート、およびエチレンジアミン四酢酸(EDTA)の少なくとも1つ、より好ましくは少なくとも2つ、最も好ましくは3つ全て(3つ全ての組み合わせは、「パネル番号9」とも呼ばれる)が、好ましくは本明細書中上記に特定されるマトリックスチェックとして、決定される。好ましくは、サンプル中のEDTAの存在は、EDTAが抗凝固剤として用いられたことを示すが、増加量のシトреートは、シトреートが抗凝固剤として用いられたことを示す。さらに、アスパルテートの増加は、凝固阻害剤が用いられなかったことを示す。従って、バイオマーカーであるアスパルテート、シトреート、およびEDTAは、サンプルが採血管選択に関連する因子によって損なわれたか否か識別することを可能とする。このため、好ましくは、EDTA血漿が参照として用いられる場合の各方向の変化は：EDTA下降ならびに/またはシトреート上昇および/もしくは

アスパルテート上昇であり、ここで好ましくは前記方向の変化は、前記サンプルがEDTAサンプルではないことを示す。

【0037】

従って、好ましい実施形態において、少なくとも、表1のパネル3\_a、13\_a、15\_a、16\_a、1\_a、1\_b、10\_a、11\_a、12\_a、13\_b、14\_a、14\_b、17\_b、18\_b、19\_a、19\_b、2\_b、20\_b、3\_b、4\_a、5\_a、5\_b、6\_a、7\_a、7\_bまたは8\_bのマーカーが、パネル9のマーカーと組み合わせて決定される。さらに好ましい実施形態において、少なくとも、表2のパネル1、2、3、4、5、6、7、8、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20のマーカーが、パネル9のマーカーと組み合わせて決定される。より好ましい実施形態において、少なくとも、表2aのパネル6\_mまたは17\_mのマーカーが、パネル9のマーカーと組み合わせて決定される。なおより好ましい実施形態において、参照は、抗凝固剤としてEDTAを含むサンプルであり、より好ましくは、参照はEDTA血漿であり、好ましくは、少なくとも、表2aのパネル3\_m、10\_m、16\_m、18\_m、19\_mまたは20\_mの少なくとも1つのマーカーが、本発明の方法において決定される。別の好ましい実施形態において、少なくとも、表2aのパネル6\_mのマーカー(このマーカーは、好ましくは極性画分からLC-MS/MSにより分析することができる)が決定されるか；または少なくとも、表2aのパネル15\_mのマーカーが決定されるか；または少なくとも、最高性能(AUC値)を有する表2aのパネル17\_mのマーカーが、本発明の方法において決定される。別の好ましい実施形態において、少なくとも、表2aのパネル3\_m、15\_m、16\_m、18\_m、19\_mまたは20\_mのマーカーが決定され、このマーカーを、好ましくは極性画分からGCおよび質量分析の組み合わせによって(特にGC-MSにより)分析することができるか；または、好ましくは、少なくとも、表2aのパネル3\_m、15\_m、16\_m、18\_m、19\_mまたは20\_mのマーカーが決定され、このマーカーを、好ましくは極性画分からLCおよび質量分析の組み合わせによって(特にLC-MS/MSにより)分析することができる。

【0038】

10

20

【表2a】

表2a: 「マトリックスチェック」マーカー(パネル9によるマトリックスチェックマーク)を付加的に包含する、さらに改良された本発明のマーカーパネル；パネル番号、それに含まれるマーカー、および不十分な品質を示す変化の方向が示される。

パネル番号	マーカー	方向
3_m	グリセレート	上昇
	グリセロール-3-リン酸	上昇
	グルタメート/グルタミン サンプル内比	上昇
	ヒポキサンチン	上昇
	3-ホスホグリセレート (3-PGA)	上昇
	アスパルテート	上昇
	グルタメート	上昇
	グルタミン	下降
	オルニチン	上昇
	シトレート	上昇
	システイン	下降
	エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)	下降
	トレオノ酸	上昇
	アルギニン	下降
	アスパラギン	下降
	アスパルテート/アスパラギン サンプル内比	上昇
	オルニチン/アルギニン サンプル内比	上昇
	リボース	上昇
	シスチン	下降
	グルコース	下降
	ラクテート	上昇
	タウリン	下降
	ラクテート/グルコース サンプル内比	上昇
	シトルリン	上昇
	マルトース	上昇
	アラニン	上昇
	マルトトリオース	上昇
	尿酸	上昇
6_m	グリセロール-3-リン酸	上昇
	グルタメート/グルタミン サンプル内比	上昇
	アスパルテート	上昇
	グルタメート	上昇
	グルタミン	下降
	シトレート	上昇
	アルギニン	下降
	アスパラギン	下降
	アスパルテート/アスパラギン サンプル内比	上昇
	グルコース-6-リン酸	上昇
10_m	ペントース	上昇
	クレアチニン	上昇
	グリセレート	上昇
	グリセロール-3-リン酸	上昇

10

20

30

40

	ヒポキサンチン	上昇	10
	3-ホスホグリセレート (3-PGA)	上昇	
	アスパルテート	上昇	
	グルタメート	上昇	
	グルタミン	下降	
	オルニチン	上昇	
	シトレート	上昇	
	システイン	下降	
	エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)	下降	
	トレオニン	上昇	
	3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸 (DOPAC)	下降	
	アルギニン	下降	
	3,4-ジヒドロキシフェニルグリコール (DOPEG)	下降	
	アスパラギン	下降	
	リボース	上昇	
	シスチン	下降	
	グルコース	下降	
	ラクテート	上昇	
	タウリン	下降	
	シトルリン	上昇	
	マルトース	上昇	
15_m	グリセレート	上昇	20
	グリセロール-3-リン酸	上昇	
	グルタメート/グルタミン サンプル内比	上昇	
	ヒポキサンチン	上昇	
	3-ホスホグリセレート (3-PGA)	上昇	
	アスパルテート	上昇	
	グルタメート	上昇	
	グルタミン	下降	
	オルニチン	上昇	
	シトレート	上昇	
	エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)	下降	
	アルギニン	下降	
	アスパラギン	下降	
	オルニチン/アルギニン サンプル内比	上昇	
16_m	リボース	上昇	30
	グルコース	下降	
	ラクテート	上昇	
	タウリン	下降	
	グリセレート	上昇	
	グリセロール-3-リン酸	上昇	
	グルタメート/グルタミン サンプル内比	上昇	
	ヒポキサンチン	上昇	
	3-ホスホグリセレート (3-PGA)	上昇	
	アスパルテート	上昇	

17_m	システィン	下降	10
	エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)	下降	
	トレオノン酸	上昇	
	アルギニン	下降	
	アスパラギン	下降	
	アスパルテート/アスパラギン サンプル内比	上昇	
	オルニチン/アルギニン サンプル内比	上昇	
	リボース	上昇	
	シスチン	下降	
	グルコース	下降	
	ラクテート	上昇	
	タウリン	下降	
	ラクテート/グルコース サンプル内比	上昇	
	マルトース	上昇	
	グリセレート	上昇	
	グリセロール-3-リン酸	上昇	
	グルタメート/グルタミン サンプル内比	上昇	
	ヒポキサンチン	上昇	
	3-ホスホグリセレート (3-PGA)	上昇	
18_m	アスパルテート	上昇	20
	グルタメート	上昇	
	グルタミン	下降	
	オルニチン	上昇	
	3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸 (DOPAC)	下降	
	3,4-ジヒドロキシフェニルグリコール (DOPEG)	下降	
	アスパラギン	下降	
	アスパルテート/アスパラギン サンプル内比	上昇	
	オルニチン/アルギニン サンプル内比	上昇	
	リボース	上昇	
	スフィンゴシン (d18:1)	下降	
	スフィンゴシン-1-リン酸 (d18:1)	上昇	
	スフィンゴシン (d16:1)	下降	
	スフィンゴシン-1-リン酸 (d16:1)	上昇	
	12-ヒドロキシエイコサテトラエン酸 (C20:シス[5,8,10,14]4)	下降	
	ラクテート/グルコース サンプル内比	上昇	
	15-ヒドロキシエイコサテトラエン酸 (C20:シス[5,8,11,13]4)	上昇	
	コレステリルエステルヒドロペルオキシド (C20:4-OOH)	上昇	
	ホスファチジルコリンヒドロペルオキシド (C16:0,C18:1-OOH)	上昇	30
	3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン (DOPA)	下降	
	セロトニン (5-HT)	下降	
	グリセレート	上昇	
18_m	グリセロール-3-リン酸	上昇	40
	グルタメート/グルタミン サンプル内比	上昇	
	ヒポキサンチン	上昇	
	アスパルテート	上昇	
	オルニチン	上昇	

19_m	シトレーント	上昇
	エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)	下降
	トレオノ酸	上昇
	アルギニン	下降
	グリセレート	上昇
	グリセロール-3-リン酸	上昇
	グルタメート/グルタミン サンプル内比	上昇
	ヒポキサンチン	上昇
	アスパルテート	上昇
	シトレーント	上昇
20_m	エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)	下降
	トレオノ酸	上昇
	オルニチン/アルギニン サンプル内比	上昇
	グリセレート	上昇
	グリセロール-3-リン酸	上昇
	グルタメート/グルタミン サンプル内比	上昇
	ヒポキサンチン	上昇
	アスパルテート	上昇
	オルニチン	上昇
	シトレーント	上昇

10

20

30

40

50

## 【0039】

本明細書中で使用される用語「サンプル」は、生物学的材料、および特に本明細書中上記に示されるバイオマーカーを含むサンプルを指す。好ましくは、本発明によるサンプルは、体液(好ましくは、涙液、乳汁、唾液もしくは尿)に由来するサンプル、または、例えば生検により、細胞、組織または器官に由来するサンプルである。より好ましくは、サンプルは血液または血液製剤、最も好ましくは血漿サンプルである。前述のサンプルは、本明細書中他の箇所で特定される被験体に由来し得る。前述の様々なタイプの生物学的サンプルを得るための技術は当技術分野において周知である。例えば、血液サンプルは、例えば生検により、組織または器官サンプルを入手する際の採血によって得ることができる。好ましくは、サンプルは、全血、血清、または血漿サンプルである。好ましい実施形態において、サンプルは、血液血漿サンプル、好ましくはシトレーント血漿サンプルまたはEDTA血漿サンプルである。別の好ましい実施形態において、サンプルは血液血清サンプルである。

## 【0040】

前述のサンプルは、好ましくは、それらが本発明の方法に使用される前に前処理される。以下により詳細に記載されるとおり、前記前処理は、本化合物を放出もしくは分離するため、または過剰な材料もしくは廃棄物を除去するために必要とされる処理を含み得る。さらに、前処理は、サンプルの滅菌および/または望ましくない細胞、細菌またはウイルスなどの夾雑物の除去を目的とするものであり得る。好適な技術は、遠心分離、抽出、分画、限外濾過およびタンパク質沈殿、それに続く濾過ならびに精製および/または化合物の濃縮を含む。さらに、他の前処理は、好ましくは、化合物分析に適した形態または濃度の化合物を提供するために実施される。例えば、ガスクロマトグラフィー結合質量分析が本発明の方法において使用される場合、前記ガスクロマトグラフィーの前に化合物を誘導体化することが必要とされ得る。好適且つ必要な前処理はまた、本発明の方法を実施するために用いられる手段によって決定され、当業者に周知である。好ましい実施形態において、好ましくは水溶液中の、バッファー化合物がサンプルに添加される。バッファー化合

物、特に中性バッファー化合物は、主に当業者に公知である。さらに好ましい実施形態において、サンプルに含まれるタンパク質は、好ましくは適切な有機溶媒の添加によって、沈殿する。タンパク質を沈殿させるための適切な有機溶媒は当技術分野において公知である。さらに好ましい実施形態において、好ましくはサンプルの遠心分離によって、極性相と親油性相との分離を可能とするため、少なくとも1つの相分離剤がサンプルに添加される。前記の前処理されたサンプルはまた、本発明により用いられる用語「サンプル」に含まれる。

【0041】

好ましい実施形態において、極性相および親油性相は、サンプルから前述のステップにより得られる。さらに好ましい実施形態において、本発明のマーカーの値は、極性相または親油性相から決定される。当業者は、所与のマーカーが確実に極性相または親油性相のいずれかに含まれるようパラメータを調整する方法について理解している。さらに好ましい実施形態において、極性相または親油性相から少なくとも2つ、または少なくとも3つの本発明のマーカーの値が決定される。好ましい実施形態において、パネルの全マーカーの値が極性相から決定される。別の好ましい実施形態において、パネルの全マーカーの値が親油性相から決定される。

10

【0042】

好ましい実施形態において、サンプル中に含まれるパネルの少なくとも1つ、少なくとも2つ、または少なくとも3つのマーカーが、本明細書中の他の箇所および実施例において特定されるとおりに誘導体化される。さらに好ましい実施形態において、サンプル中に含まれるパネルの全マーカーが、本明細書中の他の箇所および実施例において特定されるとおりに誘導体化される。好ましい実施形態において、極性相に含まれるマーカーが、メトキシム化およびシリル化、好ましくはトリメチルシリル化によって誘導体化される。さらに好ましい実施形態において、親油性相に含まれるマーカーは、トランスメチル化、メトキシム化およびシリル化、好ましくはトリメチルシリル化によって誘導体化される。

20

【0043】

さらに好ましい実施形態において、サンプル中に含まれるパネルの少なくとも1つ、少なくとも2つ、または少なくとも3つのマーカーは誘導体化されない。さらに好ましい実施形態において、サンプル中に含まれるパネルのマーカーは全く誘導体化されない。

30

【0044】

本発明により言及されるサンプルは、好ましくは被験体に由来する。本明細書で使用される用語「被験体」は、動物、好ましくは哺乳動物に関する。より好ましくは、被験体は、家畜、実験動物またはコンパニオン動物であり、例えば、好ましくは、マウス、ラット、ヤギ、ヒツジ、ブタ、ウマ、ロバ、イヌ、ネコ、モルモット、または靈長類などが挙げられる。最も好ましくは、被験体はヒトである。被験体は、好ましくは、疾患もしくは病態に罹患している疑いがあるかまたは無く、あるいは疾患もしくは病態を発症する危険性があるかまたは無い。

【0045】

用語「値」は当業者により理解され、本発明のバイオマーカーの少なくとも1つの濃度の測定に基づく任意の測定パラメータまたは計算パラメータに関する。好ましくは、上記値は、1つのバイオマーカーの絶対濃度または相対濃度、または少なくとも2つのバイオマーカーの濃度の比、好ましくは少なくとも2つのバイオマーカーのサンプル内比である。

40

【0046】

従って、用語「値を決定する」は、好ましくは本発明のマーカーの値を決定することに関する。好ましくは、「値を決定する」は、バイオマーカーの少なくとも1つの濃度値から誘導される計算値を決定することであるか、または「値を決定する」は、本明細書中以下に特定されるバイオマーカーの量を決定することである。本明細書で使用される用語「量を決定する」は、サンプル中で本発明の方法により決定されるバイオマーカーの少なくとも1つの特徴的特性を決定することに関する。本発明による「特徴的特性」は、マーカーの物理的および/または化学的特性(生化学的特性を含む)を特徴付ける特性である。

50

このような特性としては、例えば、分子量、粘度、密度、電荷、 спин、光学活性、色、蛍光、化学発光、元素組成、化学的構造、他の化合物と反応する能力、生物学的読み取りシステムにおいて応答を惹起する能力(例えばレポーター遺伝子の誘導)などが挙げられる。前記特性の値は、特徴的特性としての役割を果たすことが可能であり、当技術分野において周知の技術により決定することができる。さらに、特徴的特性は、バイオマーカーの物理的および/または化学的特性の値から標準的な演算(例えば、乗算、除算または対数微積分などの数学的計算)によって誘導される任意の特性であり得る。最も好ましくは、少なくとも1つの特徴的特性は、前記少なくとも1つのマーカーおよびその量の決定および/または化学的同定を可能とする。従って、特性値は、好ましくは、そこから特性値が誘導されるバイオマーカーの存在量に関連する情報も含む。例えば、バイオマーカーの特性値は、質量スペクトル中のピークであり得る。このようなピークは、バイオマーカーの特性情報(すなわちm/z情報)ならびにサンプル中の前記バイオマーカーの存在量(すなわちその量)に関連する強度値を含む。

#### 【0047】

好ましい実施形態において、特徴的特性の値は、計算値または組み合わせ値(例えば、本明細書中他の箇所に示される「エラスティックネット(elastic net)」のような分類アルゴリズムのスコア)であってもよい。好ましい実施形態において、本発明の方法のマーカーの量に基づいてスコア(特に单ースコア)を計算し、このスコアを参照スコアに対して比較することが想定される。好ましくは、組み合わせ値(「スコア」)は、血液製剤に由来するサンプル中のマーカーの量に基づく。例えば、パネル3\_aのバイオマーカーの量が決定される場合、計算スコアは、サンプル中のオルニチン、グリセロール-3-リン酸、およびグリセレートの量に基づく。好ましい実施形態において、計算スコアは、マーカーの量についての情報を組み合わせる。好ましくは、上記スコアにおいて、マーカーは、それらの結果の確立への寄与に従って重みづけされる。本発明の方法において適用されるマーカーの組み合わせに基づいて、個々のバイオマーカーの重みが異なり得る。このスコアは、好ましくは、血液製剤サンプルの品質を評価するための分類パラメータと考えることができる。より好ましくは、上記スコアは、参照スコアとの比較に基づく、单ースコアに基づく評価を可能とする。参照スコアは、好ましくは値、特に血液製剤の十分な品質と不十分な品質とを識別することを可能とするカットオフ値である。好ましくは、参照は单一値であり；従ってオペレーターは、個々のマーカーの量についての全情報を理解する必要がない。好ましくは、本明細書中に記載されるスコアリングシステムを使用して、有利には、バイオマーカーの異なる次元または単位の値を、これらの値がスコアに数学的に変換されるため、利用することができる。従って、本発明の好ましい実施形態において、本発明の方法のステップb)に示されるマーカーの量の参照に対する比較は、ステップa)において言及される決定されたマーカーの値に基づいてスコアを計算するステップb1)、およびこのようにして計算スコアを参照スコアに対して比較するステップb2)を包含する。より好ましくは、ロジスティック回帰法は、スコアを計算するために使用され、最も好ましくは、前記ロジスティック回帰法は、エラスティックネット正則化を含む。

#### 【0048】

さらに好ましい実施形態において、マーカーのそれぞれの量は、対応する参照に対して比較され、ここでこの比較の結果は、組み合わせ値(スコア)、特に单ースコアの計算に用いられ、またここで前記スコアは、本明細書中の他の箇所で特定される参照スコアに対して比較される。

#### 【0049】

好ましい実施形態において、スコアは、好適なスコアリングアルゴリズムに基づいて計算される。前記スコアリングアルゴリズムは、好ましくは、決定されたマーカーの値に基づいて、血液製剤が十分な品質であるのか、または十分な品質ではないのか識別することを可能とすべきである。好ましくは、前記スコアリングアルゴリズムは、十分な品質であることが既知のサンプル中の、また不十分な品質であることが既知のサンプルに由来する個々のマーカーの量に関する情報を比較することにより予め決定されている。従って、本

発明の方法のステップb)は、スコアリングアルゴリズムを決定または実行するステップb0)も含み得る。好ましくは、このステップは、ステップb1)およびb2)の前に実施される。好適なスコアリングアルゴリズムは、本発明のマーカーを用いて、当業者によりさらなる苦労なく決定することができる。例えば、スコアリングアルゴリズムは、幾つかの十分な品質および不十分な品質のサンプル中のマーカーの量に関する情報を用いる数学的関数であり得る。スコアリングアルゴリズムを決定する方法は当技術分野において周知であり、例えば、マイクロアレイの有意性分析(Significance Analysis of Microarrays)、ツリーハーベスティング(Tree Harvesting)、CART、MARS、自己組織化マップ(Self Organizing Maps)、多頻度アイテム集合(Frequent Item Set)、ベイジアンネットワーク(Bayesian networks)、マイクロアレイの予測分析(Prediction Analysis of Microarray)(PAM)、SMO、単純ロジスティック回帰(Simple Logistic Regression)、ロジスティック回帰(Logistic Regression)、多層パーセプトロン(Multilayer Perceptron)、ベイズネット(Bayes Net)、ナイーブベイズ(Naive Bayes)、単純ナイーブベイズ(Naive Bayes Simple)、ナイーブベイズアップ(Naive Bayes Up)、IB1、Ibk、Kstar、LWL、アダブースト(AdaBoost)、クラスヴィア回帰(ClassViaRegression)、デコレート(Decorate)、多クラス分類(Multiclass Classifier)、ランダムコミッティー(Random Committee)、j48、LMT、NBTree、パート(Part)、ランダムフォレスト(Random Forest)、順序分類(Ordinal Classifier)、低密度線形プログラミング(Sparse Linear Programming)(SPLP)、低密度ロジスティック回帰(Sparse Logistic Regression)(SPLR)、エラスティックネット(Elastic net)、サポートベクターマシン(Support Vector Machine)、予測残差平方和(Prediction of Residual Error Sum of Squares)(PRESS)、罰金付きロジスティック回帰(Penalized Logistic Regression)、相互情報量(Mutual Information)などが挙げられる。典型的には、分類アルゴリズム(例えば、エラスティックネット法を実行する分類アルゴリズム)をスコアリングに用いることができる(Zou 2005, Journal of the Royal Statistical Society, Series B : 301-320, Friedman 2010, J. Stat. Sotw. 33)。従って、血液製剤についてのスコアは、好ましくは、例えばRパッケージglmnetにおいて実行されるようなエラスティックネットアルゴリズムを用いることによって、適合させたロジスティック回帰モデルで計算することができる。

#### 【0050】

好ましい実施形態において、参照組み合わせ値(「参照スコア」)は、不十分な品質であることが既知の血液製剤に由来するサンプルから得られる。このような場合、参照スコアと本質的に同一であるサンプル中のスコアは不十分な品質を示す。さらに、参照スコアは、好ましくは十分な品質であることが既知の血液製剤に由来するサンプルからも得られる。このような場合、参照スコアに対して変化している試験サンプル中のスコアは、不十分な品質を示す。あるいは、前記参照スコアと本質的に同一であるサンプル中のスコアは、十分な品質を示す。

#### 【0051】

本発明の(例えば、方法、デバイス、使用等の)好ましい実施形態において、参照スコアはカットオフ値、好ましくは単一カットオフ値である。好ましくは、前記値により、血液製剤を十分な品質の血液製剤の群または不十分な品質の血液製剤の群に割り当てることが可能となる。別の本発明の(例えば、方法、デバイス、使用等の)好ましい実施形態において、参照スコアは参照スコア範囲である。この文脈において、十分な品質を示す参照スコア範囲、不十分な品質を示す参照スコア範囲、または2つの参照スコア範囲(すなわち十分な品質を示す参照スコア範囲および不十分な品質を示す参照スコア範囲)を適用することができる。

#### 【0052】

先に検討したとおり、サンプルに含まれる各バイオマーカーは、好ましくは、本発明により定量的または半定量的に決定され得る。定量的決定については、バイオマーカーの絶対量または正確な量のいずれかが決定されるか、または本明細書中上記で言及した特徴的特性(1つまたは複数)について決定された値に基づいて、バイオマーカーの相対量が決定

10

20

30

40

50

される。相対量は、バイオマーカーの正確な量を決定することができないか、または決定すべきでない場合に決定され得る。前記の場合、前記バイオマーカーを第2の量で含む第2のサンプルについて、バイオマーカーが存在する量が増加するかまたは低下するかを決定することができる。好ましい実施形態において、前記バイオマーカーを含む前記第2のサンプルは、本明細書中の他の箇所で特定される計算参考であるべきである。バイオマーカーの定量的分析は、従って、バイオマーカーの半定量的分析と呼ばれることもある定量的分析も包含する。

#### 【0053】

さらに、本発明の方法において用いられる決定は、好ましくは、先に言及した分析ステップの前の化合物分離ステップの使用を包含する。好ましくは、前記化合物分離ステップは、サンプルに含まれる代謝産物の時間および/または空間分解分離を生じる。本発明により好ましく用いられる分離に適した技術は、従って、液体クロマトグラフィー(LC)、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、ガスクロマトグラフィー(GC)、薄層クロマトグラフィー、サイズ排除またはアフィニティーコロマトグラフィーなどのあらゆるクロマトグラフィー分離技術を包含する。これらの技術は当技術分野において周知であり、当業者によりさらなる苦労なく適用することができる。最も好ましくは、LCおよび/またはGCは、本発明の方法により想定されるクロマトグラフィー技術である。バイオマーカーのこのような決定に適したデバイスは当技術分野において周知である。好ましくは、質量分析、特にガスクロマトグラフィー質量分析(GC-MS)、液体クロマトグラフィー質量分析(LC-MS)、直接注入質量分析またはフーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴質量分析(FT-ICR-MS)、キャピラリー電気泳動質量分析(CE-MS)、高速液体クロマトグラフィー結合質量分析(HPLC-MS)、超高速液体クロマトグラフィー質量分析(UPLC-MS)、四重極質量分析、任意の連続結合質量分析(例えば、MS-MSまたはMS-MS-MS)、誘導的連結プラズマ質量分析(ICP-MS)、熱分解質量分析(Py-MS)、イオン移動度質量分析または飛行時間質量分析(TOF)が用いられる。前記技術は、例えば、Nissen 1995, Journal of Chromatography A, 703 : 37-57、US 4,540,884またはUS 5,397,894に開示され、その開示内容は参照により本明細書に組み込まれる。より好ましくは、本明細書中で使用される質量分析法は、四重極MSを包含する。最も好ましくは、前記四重極MSは、以下のとおりに実施される：a) 質量分析計の第1の分析的四重極におけるイオン化によって生じたイオンの質量/電荷指數( $m/z$ )の選択、b) 衝突ガスが充填されており、衝突チャンバとして機能するさらなる次の四重極中で加速電位を印加することによる、ステップa)において選択されたイオンのフラグメント化、c) さらなる次の四重極中の、ステップb)におけるフラグメント化プロセスにより生じたイオンの質量/電荷指數の選択(これにより本方法のステップa)～c)が少なくとも1回実施される)、およびイオン化プロセスの結果としての物質の混合物中に存在する全イオンの質量/電荷指數の分析(これにより四重極に衝突ガスが充填されるが、分析中に加速電位は印加されない)。本発明により使用される前記の最も好ましい質量分析についての詳細は、WO2003/073464中に見出すことができる。質量分析技術の代替としてまたはこれに加えて、以下の技術を化合物決定に使用することができる：核磁気共鳴(NMR)、磁気共鳴画像法(MRI)、フーリエ変換赤外線法(FT-IR)、紫外線(UV)分光法、屈折指數法(RI)、蛍光検出法、放射化学的検出法、電気化学的検出法、光散乱法(LS)、分散的ラマン分光法または水素炎イオン化検出法(FID)。これらの技術は当業者に周知であり、さらなる苦労なく適用することができる。

#### 【0054】

より好ましくは、質量分析法は、LC-MSおよび/またはGC-MS(すなわちクロマトグラフィー分離ステップの前に機能的に連結された質量分析法)である。本明細書中で使用される液体クロマトグラフィーは、液相または超臨界相における化合物(すなわち代謝産物)の分離を可能とする全ての技術を指す。液体クロマトグラフィーは、移動相中の化合物が固定相を通過することを特徴とする。化合物が固定相を異なる速度で通過する場合、各個別化合物がそれらの特定の保持時間(すなわち化合物がシステムを通過するために必要とする時間)を有するため、時間で分離される。本明細書中で使用される液体クロマトグラフィー

10

20

30

40

50

ーとして、例えばHPLCも挙げられる。液体クロマトグラフィー用のデバイスは、例えば、Agilent Technologies社(USA)から市販されている。本発明により適用されるガスクロマトグラフィーは、原理上、液体クロマトグラフィーと同等に作動する。しかし、固定相を通過する液体移動相中に化合物(すなわち代謝産物)を有するのではなく、化合物は気体体積として存在する。化合物は、固定相としての固体支持体物質を含み得るか、もしくはその壁が固定相としての役割を果たし得るか、または固定相でコーティングされているカラムを通過する。上記と同様、各化合物は、カラムを通過するために必要とされる特定の時間を有する。さらに、ガスクロマトグラフィーの場合、好ましくは化合物がガスクロマトグラフィーの前に誘導体化されることが想定される。誘導体化に適した技術は当技術分野において周知である。好ましくは、本発明による誘導体化は、好ましくは極性化合物の、メトキシム化およびシリル化、より好ましくはトリメチルシリル化、ならびに好ましくは非極性(すなわち親油性)化合物の、トランスメチル化、メトキシム化およびシリル化、より好ましくはトリメチルシリル化に関する。

#### 【0055】

さらに、少なくとも1つのバイオマーカーは、特定の化学的または生物学的アッセイによって決定することもできる。前記アッセイは、サンプル中で少なくとも1つのマーカーを特異的に検出すること可能とする手段を含むべきである。好ましくは、前記手段は、バイオマーカーの化学的構造を特異的に認識することができるか、または、バイオマーカーが他の化合物と反応する能力または生物学的読み取りシステムにおいて応答を惹起する能力(例えば、レポーター遺伝子の誘導)に基づいてバイオマーカーを特異的に同定することができる。バイオマーカーの化学的構造を特異的に認識することができる手段は、好ましくは、化学的構造と特異的に相互作用する抗体または他のタンパク質(例えば受容体または酵素)である。特異的抗体は、例えば、バイオマーカーを抗原として用いて、当技術分野において周知の方法によって得ることができる。本明細書中で言及される抗体としては、例えば、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体の両方、ならびにそれらのフラグメント(例えば抗原またはハプテンに結合し得るFv、FabおよびF(ab)2フラグメント)が挙げられる。また本発明は、所望の抗原特異性を示す非ヒトドナー抗体のアミノ酸配列がヒトアクセプター抗体の配列と組み合わされているヒト化ハイブリッド抗体も包含する。さらに、単鎖抗体も包含される。ドナー配列は、通常、少なくともドナーの抗原結合アミノ酸残基を含むが、ドナー抗体の他の構造的におよび/または機能的に関連するアミノ酸残基も含み得る。このようなハイブリッドは、当技術分野において周知の幾つかの方法によって調製することができる。バイオマーカーを特異的に認識することができる好適なタンパク質は、好ましくは、前記バイオマーカーの代謝的変換に関与する酵素である。前記酵素は、バイオマーカーを基質として使用することもできるし、または基質をバイオマーカーに変換することもできる。さらに、前記抗体は、バイオマーカーを特異的に認識するオリゴペプチドを作製するための基盤として使用することができる。これらのオリゴペプチドは、例えば、前記バイオマーカー用の酵素の結合ドメインまたはポケットを含むべきである。好適な抗体および/または酵素ベースのアッセイは、RIA(ラジオイムノアッセイ)、ELISA(酵素連結免疫吸着アッセイ)、サンドウィッチ酵素免疫試験、電気化学発光サンドwichイッチ免疫アッセイ(ECLIA)、解離強化ランタニドフルオロ免疫アッセイ(DELFIA)または固相免疫試験であり得る。さらに、バイオマーカーは、他の化合物と反応するその能力に基づいて(すなわち特定の化学的反応により)決定することもできる。さらに、バイオマーカーは、生物学的読み取りシステムにおいて応答を惹起するその能力により、サンプル中で決定することができる。生物学的応答は、サンプルに含まれるバイオマーカーの存在および/または量を示す読み取り値として検出されるべきである。生物学的応答は、例えば、遺伝子発現の誘導または細胞もしくは生物の表現型応答であり得る。好ましい実施形態において、少なくとも1つのバイオマーカーの決定は定量的プロセスであり、例えば、サンプル中の少なくとも1つのバイオマーカーの量の決定も可能とする。

#### 【0056】

本明細書中で使用される用語「参照」は、サンプル中のまたは既知の品質の複数のサン

10

20

30

40

50

プル中の本発明のマーカーの特徴的特性の値または値の範囲を指す。好ましくは、参照は、マーカーの閾値の値(例えば、量または量の比)であって、これにより前記閾値が特徴的特性について可能な値の範囲を第1の部分と第2の部分とに分割するような値である。これらの部分の一方は不十分な品質に関連するが、他方は十分な品質に関連する。閾値自体はまた、十分な品質に関連する場合もあれば、不十分な品質に関連する場合もある。閾値が不十分な品質に関連する場合、閾値と本質的に同一であるかまたは不十分な品質に関連する部分に分類される研究対象のサンプル中に見られる値は、従って、サンプルの不十分な品質を示す。閾値が十分な品質に関連する場合、閾値と本質的に同一であるかまたは十分な品質に関連する部分に分類される研究対象のサンプル中に見られる値は、サンプルの十分な品質を示す。従って、好ましくは、閾値はカットオフ値である。本明細書中上記に詳述されるとおり、評価することがサンプルを2つのクラスのうちの1つ(例えば、好ましくは許容可能な品質または許容不可能な品質)に分類することに関する場合、参照は、好ましくは閾値またはカットオフ値であり得る。3つ以上のクラスへの分類が行われる場合、2つ以上の参照値が前記分類に関連し得る(例えば、好ましくは、2つの参照値を使用して、3つのクラス間の境界を規定することができる)ことが当業者により理解される。

10

## 【0057】

好ましくは、参照値(例えば、好ましくは、少なくとも1つのマーカーの少なくとも1つの特徴的特性の値またはそれらの比)は、データベースなどの適切なデータ保存媒体に保存され、このようにしてさらなる評価に利用することもできる。当業者によって理解されるとおり、参照値からの予想外に高い(例えば、好ましくは10倍超の)逸脱が、系統誤差(これは、非限定的な例として、サンプルの不完全な希釈または装置の機能障害であり得る)によって引き起こされる場合もあり；当業者は、このような場合に結果を再照合しなければならないことについて理解している。

20

## 【0058】

前述の本発明の方法によれば、参照は、好ましくは、既知の品質のサンプルまたは複数サンプル(すなわち、好ましくは、1、2、3、4、5、10、50または100超のサンプル)から得られる参照である。好適な参照値(好ましくは平均値または中央値)の計算方法は、当技術分野において周知である。好ましくは、参照は、不十分な品質であることが既知のサンプルまたは複数サンプルに由来する。このような場合、本質的に同一であるサンプル中に見られるマーカーの値は不十分な品質を示すが、異なるサンプル中に見られるマーカーの値は、十分な品質を示す。好ましくは、このような場合、パネルの少なくとも $x$ 個のマーカー(1つまたは複数)が前記参照と本質的に同一である場合にサンプルが不十分な品質を有すると分類され(ここで $x$ は1、2、...、(n-1)からなるリストから選択され、n=前記パネル中のマーカーの数である)；より好ましくは、パネルの全マーカーが前記参照と本質的に同一である場合にサンプルが不十分な品質を有すると分類される。

30

## 【0059】

同様に好ましくは、前記参照は、十分な品質であることが既知のサンプルまたは複数サンプルに由来する。より好ましくは、このような場合、前記参照と本質的に同一であるサンプル中のマーカーの値は十分な品質を示すが、それと異なる量は不十分な品質を示す。好ましくは、表1、表2、または表2aに示される方向の変化は不十分な品質を示す。好ましくは、このような場合、サンプルは、パネルの少なくとも $x$ 個のマーカー(1つまたは複数)が前記参照と異なる場合、不十分な品質を有すると分類され(ここで $x$ は1、2、...、(n-1)からなるリストから選択され、n=前記パネル中のマーカーの数である)；より好ましくは、パネルの全マーカーが前記参照と異なる場合、サンプルは不十分な品質を有すると分類される。好ましくは、サンプルが血液製剤サンプルである場合、十分な品質であることが既知のサンプルは、本明細書中他の箇所で特定される標準プロトコルにより得られるサンプルである。

40

## 【0060】

特徴的特性の値と、定量的決定の場合、強度値またはそれから計算される値とが本質的に同一である場合に、試験サンプルの少なくとも1つのマーカーの値と参照値は本質的に

50

同一である。本質的に同一であるとは、2つの値の間の差が、好ましくは有意ではなく、上記値が少なくとも参照値の第1～第99パーセンタイル、第5～第95パーセンタイル、第10～第90パーセンタイル、第20～第80パーセンタイル、第30～第70パーセンタイル、第40～第60パーセンタイルの間隔の範囲内であること、好ましくは、参照値の第50、第60、第70、第80、第90、または第95パーセンタイルであることを特徴とすべきであることを意味する。2つの量が本質的に同一であるか否かを決定するための統計的試験は、当技術分野において周知であり、本明細書中の他の箇所にも記載されている。

#### 【0061】

他方、2つの値について観察された差は、好ましくは統計的に有意であるべきである。  
上記の値の差は、好ましくは、参照値の第45～第55パーセンタイル、第40～第60パーセンタイル、第30～第70パーセンタイル、第20～第80パーセンタイル、第10～第90パーセンタイル、第5～第95パーセンタイル、第1～第99パーセンタイルの間隔の有意外側である。本明細書の表において、バイオマーカーの好ましい相対変化は、列「方向(direction)」において、増加については「上昇(up)」として、減少については「下降(down)」として示される。

10

#### 【0062】

用語「対応する参照」は、当業者により理解され、異なるサンプルに由来する(好ましくは参照サンプル中の)同じマーカーについて得られる値に関する。例えば、好ましくは、2つのバイオマーカーのサンプル内比が同じバイオマーカーの参照サンプル内比に対して比較されること、およびバイオマーカーの相対濃度が同じバイオマーカーの参照相対濃度に対して比較されること、などが当業者により理解される。

20

#### 【0063】

用語「比較する」は、決定されたマーカーの値が参照と本質的に同一であるかまたはそれらと異なるかを決定することを指す。好ましくは、本明細書中の他の箇所で言及される統計技術によって決定され得る観察された差が統計的に有意である場合、マーカーの値は参照と異なると見なされる。差が統計的に有意ではない場合、バイオマーカー値と参照とは本質的に同一である。上記で言及した比較に基づいてサンプルの品質を評価することができる。比較は、好ましくは自動化によって支援される。例えば、2つの異なるデータセットの比較のためのアルゴリズムを含む適切なコンピュータープログラム(例えば、特徴的な特性(1つまたは複数)の値を含むデータセット)を用いることができる。このようなコンピュータープログラムおよびアルゴリズムは当技術分野において周知である。上記にも関わらず、比較は手動で行うこともできる。

30

#### 【0064】

有利なことに、本発明の基礎となる研究において、特定の組み合わせのマーカー(パネル)が、サンプルが本明細書中で特定される交絡因子の1つに曝されたか否かを高感度に検出することを可能とすることが見出された。驚くべきことに、統計的分析は、単一マーカーとして使用した場合に最高AUC値を示すマーカーがこの決定に最適であるわけではないことを示した。明らかに、単一マーカーとしては比較的低い指標値のマーカーは他のマーカーとの相乗効果を示し、サンプルの品質を分析する驚くべき強力な方法をもたらす。表1のパネルの予測値は、さらなるマーカーを含めることによってさらに増加し、表2および表2aの最適化パネルをもたらし得る。

40

#### 【0065】

上記に示される定義は、変更すべきところは変更して以下に適用する。さらに以下に記載される付加的な定義および説明も、本明細書中に記載される全ての実施形態に変更すべきところは変更して適用する。

#### 【0066】

本発明はさらに、血液製剤サンプルの品質を評価するためのデバイスであって、以下のもの：

- 少なくとも、表1の少なくとも1つのパネルのマーカーに対する少なくとも1つの検出

50

器を含む前記サンプルの分析ユニットであって、前記少なくとも1つの検出器が前記サンプル中の前記マーカーの量を決定する、上記分析ユニット；およびそれに機能的に連結されている、

b) データ処理ユニットとデータベースとを含む評価ユニットであって、前記データベースは保存された対応する参照値を含み、前記データ処理ユニットは、2つのバイオマーカーのサンプル内比を計算し、分析ユニットにより決定されたマーカーの値または評価ユニットにより計算された値を前記保存された参照値に対して比較し、それに基づいて品質の評価が確立される出力情報を生成する、実体的に埋め込まれたアルゴリズムを任意選択で有する、上記評価ユニット

を含む、上記デバイスに関する。

10

#### 【0067】

「デバイス」は、この用語が本明細書中で用いられるとおり、少なくとも前述のユニットを含むべきである。上記デバイスのユニットは互いに機能的に連結されている。上記手段を作動様式で連結する方法は、デバイスに含まれるユニットの種類に応じて決まる。例えば、上記検出器がバイオマーカーの自動的な定性的または定量的決定を可能とする場合、前記自動的に作動する分析ユニットによって得られたデータは、例えば、評価ユニットにおける評価を容易にするため、コンピュータープログラムによって処理することができる。好ましくは、上記ユニットは、このような場合、單一デバイスに含まれる。好ましくは、上記デバイスは、上記バイオマーカーの分析ユニットと、評価のためおよび出力情報を確立するため得られたデータを処理するための評価ユニットとしてのコンピューターまたはデータ処理デバイスとを含む。好ましくは、上記分析ユニットは、少なくとも、本発明によるパネルのマーカーの、あるいは、より好ましくは(i) 少なくとも、マーカーであるグリセロール-3-リン酸、グリセレート、およびオルニチンの；(ii) 少なくとも、グリセロール-3-リン酸、グリセレート、およびヒポキサンチンの；(iii) 少なくとも、グリセロール-3-リン酸、オルニチン、およびヒポキサンチンの；もしくは(iv) 少なくとも、グリセレート、オルニチン、およびヒポキサンチンの；または特に少なくとも、マーカーであるグリセロール-3-リン酸、グリセレート、およびオルニチンの少なくとも1つの検出器を含み、前記少なくとも1つの検出器は、前記サンプル中の前記マーカーの量を決定する。好ましいデバイスは、専門の臨床医の特定の知識なしで適用することができるデバイス(例えば、サンプルのローディングのみを必要とする電子的デバイス)である。デバイスの出力情報は、好ましくは、サンプルの品質についての結論を誘導することを可能とする数値であり、従って、診断の信頼性またはトラブルシューティングの助けとなる。好ましい実施形態において、上記デバイスの分析ユニットは、少なくとも、パネル3\_a、13\_a、15\_a、16\_a、1\_a、1\_b、10\_a、11\_a、12\_a、13\_b、14\_a、14\_b、17\_b、18\_b、19\_a、19\_b、2\_b、20\_b、3\_b、4\_a、5\_a、5\_b、6\_a、7\_a、7\_b、8\_b、1、2、3、4、5、6、7、8、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、3\_m、6\_m、10\_m、15\_m、16\_m、17\_m、18\_m、19\_m、または20\_mのマーカーに対する少なくとも1つの検出器を含む。

20

30

30

#### 【0068】

本発明のデバイスにより保存された参照として使用される好ましい参照は、不十分な品質のサンプルまたは複数サンプルに由来する分析対象のマーカーの値またはそれらから誘導される値である。このような場合、実体的に埋め込まれたアルゴリズムは、好ましくは、マーカーについて決定された値を参照と比較し、同一のまたは本質的に同一の値は不十分な品質のサンプルを示すが、異なる値、好ましくは、表1、2、2aまたは3に示される方向とは逆方向の変化を示す値は十分な品質のサンプルを示すべきである。

40

#### 【0069】

あるいは、本発明のデバイスにより保存された参照として用いられる他の好ましい参照は、十分な品質のサンプルまたは複数サンプルに由来する分析対象のマーカーの値またはそれらから誘導される値である。このような場合、実体的に埋め込まれたアルゴリズムは、好ましくは、マーカーについて決定された値を参照と比較し、同一のまたは本質的に同一の値は十分な品質のサンプルを示すが、異なる値は不十分な品質のサンプルを示すべき

50

である。

【0070】

また上記デバイスのユニットは、好ましくは、互いに機能的に連結された幾つかのデバイスを含むシステムに実装することもできる。本発明のシステムに用いられるユニットに応じて、前記手段を、前記手段間のデータ輸送を可能にする手段(例えば、グラスファイバーケーブルおよびハイスループットデータ輸送のための他のケーブル)により各手段を相互に接続することによって機能的に連結することができる。それにも関わらず、例えば LAN(無線LAN、W-LAN)を介した上記手段間の無線データ輸送も本発明により想定される。好ましいシステムは、バイオマーカーを決定するための手段を含む。本明細書中で使用されるバイオマーカーを決定するための手段は、バイオマーカーを分離するための手段(例えばクロマトグラフィーデバイス)および代謝産物決定のための手段(例えば質量分析デバイス)を包含する。好適なデバイスは上記に詳述されている。本発明のシステムにおいて用いられる化合物分離のための好ましい手段としては、例えば、クロマトグラフィーデバイス、より好ましくは、液体クロマトグラフィー、HPLC、および/またはガスクロマトグラフィーのためのデバイスなどが挙げられる。化合物決定のための好ましいデバイスは、質量分析デバイス、より好ましくはGC-MS、LC-MS、直接注入質量分析、FT-ICR-MS、CE-MS、HPLC-MS、四重極質量分析、連続結合質量分析(MS-MSもしくはMS-MS-MSなど)、ICP-MS、Py-MSまたはTOFを含む。分離手段と決定手段は、好ましくは相互に連結されている。最も好ましくは、LC-MSおよび/またはGC-MSは、本明細書中の他の箇所に詳細に記載されるとおり、本発明のシステムにおいて用いられる。さらに含まれるとすれば、バイオマーカーの決定のための手段から得られた結果を比較および/または分析するための手段であるべきである。上記の結果を比較および/または分析するための手段は、少なくとも1つのデータベースと、測定された値の対応する参照との比較のための実装されたコンピュータープログラムとを含み得る。前述のシステムおよびデバイスの好ましい実施形態もまた、以下に詳細に記載されている。

10

20

30

40

【0071】

さらに、本発明は、サンプルの十分な品質または不十分な品質を示す、少なくとも、表1、表2、または表2aの少なくとも1つのパネルのマーカーの特性値を含むデータコレクションに関する。

【0072】

用語「データコレクション」は、物理的におよび/または論理的に一緒にグループ化され得るデータのコレクションを指す。従って、データコレクションは、單一データ保存媒体に実装されていてもよいし、互いに機能的に連結された物理的に分離されたデータ保存媒体に実装されていてもよい。好ましくは、データコレクションは、データベースにより実装される。従って、本明細書中で使用されるデータベースは、好適な保存媒体上のデータコレクションを含む。さらに、データベースは、好ましくは、データベース管理システムをさらに含む。データベース管理システムは、好ましくは、ネットワークベースの、階層的またはオブジェクト指向のデータベース管理システムである。さらに、データベースは、連邦データベースまたは統合データベースであってもよい。より好ましくは、データベースは、分配(連邦)システムとして(例えばクライアント-サーバー-システムとして)実装される。より好ましくは、データベースは、試験データセットをデータコレクションに含まれるデータセットと比較するためにアルゴリズムを検索することを可能とするよう構築される。具体的には、このようなアルゴリズムを用いることにより、上記に示されるサンプル品質を示す類似のまたは同一のデータセットについてデータベースを検索することができる(例えば、クエリーサーチ)。従って、同一のまたは類似のデータセットをデータコレクション中で同定することができる場合、試験データセットは前記品質に関連する。結果的に、データコレクションから得られる情報は、例えば、上記の本発明の方法の参照として用いることができる。より好ましくは、データコレクションは、上記に列挙される群のいずれか1つに含まれる全バイオマーカーの特性値を含む。

【0073】

50

上記を踏まえて、本発明は、前述のデータコレクションを含むデータ保存媒体を包含する。

【0074】

本明細書中で使用される用語「データ保存媒体」は、CD、CD-ROM、ハードディスク、光学的保存媒体、またはディスクケットなどの単一の物理的実体に基づくデータ保存媒体を包含する。さらに、上記用語は、前述のデータコレクションを提供するような様式で、好ましくはクエリーサーチに適した方法で、互いに機能的に連結された物理的に分離された実体からなるデータ保存媒体をさらに包含する。

【0075】

本発明はまた、以下のもの：  
10

- (a) (b)に機能的に連結されている、サンプルのマーカーの特性値を比較する手段
  - (b) 本発明によるデータ保存媒体、
- を含む分析システムにも関する。

【0076】

本明細書中で使用される用語「分析システム」は、互いに機能的に連結された異なる手段に関する。前記手段は、單一デバイスに実装されていてもよいし、互いに機能的に連結された物理的に分離されたデバイスであってもよい。マーカーの特性値を比較する手段は、好ましくは、前述の比較のためのアルゴリズムまたはスコアに基づく。データ保存媒体は、好ましくは前述のデータコレクションまたはデータベースを含み、ここで保存されたデータセットのそれぞれは、上記で言及されたサンプル品質を示している。従って、本発明の分析システムは、試験データセットが、データ保存媒体に保存されたデータコレクションに含まれているか否か同定することを可能とする。結果的に、本発明の方法は、本発明の分析システムによって実行することができる。

20

【0077】

分析システムの好ましい実施形態において、サンプルのバイオマーカーの特性値を決定するための手段が含まれる。用語「バイオマーカーの特性値を決定するための手段」は、好ましくは、代謝産物の決定のための前述のデバイス、例えば、質量分析デバイス、NMRデバイス、またはバイオマーカーの化学的もしくは生物学的アッセイを実施するためのデバイスに関する。

【0078】

30  
本発明はまた、血液製剤サンプルの品質を評価するための、少なくとも、表1の少なくとも1つのパネルのマーカー、またはそれらの検出剤もしくは検出試薬の使用にも関する。好ましくは、前記パネルは、(i) グリセロール-3-リン酸、グリセレート、およびオルニチン；(ii) グリセロール-3-リン酸、グリセレート、およびヒポキサンチン；(iii) グリセロール-3-リン酸、オルニチン、およびヒポキサンチン；(iv) グリセレート、オルニチン、およびヒポキサンチン；または(v) グルタミン、グリセロール-3-リン酸、グルタミン酸塩、およびヒポキサンチンを含み；特に前記パネルは、グリセロール-3-リン酸、グリセレート、およびオルニチンを含み、あるいは前記パネルは、グルタミン、グリセロール-3-リン酸、グリセレート、およびヒポキサンチンを含む。好ましい実施形態において、前記少なくとも1つのパネルは、パネル3\_a、13\_a、15\_a、16\_a、1\_a、1\_b、10\_a、11\_a、12\_a、13\_b、14\_a、14\_b、17\_b、18\_b、19\_a、19\_b、2\_b、20\_b、3\_b、4\_a、5\_a、5\_b、6\_a、7\_a、7\_b、8\_b、1、2、3、4、5、6、7、8、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、3\_m、6\_m、10\_m、15\_m、16\_m、17\_m、18\_m、19\_m、または20\_mである。

40

【0079】

さらに、本発明は、ハウジング中に含まれる、少なくとも、表1の少なくとも1つのパネルのマーカーの少なくとも1つの検出剤および/または前記マーカーの参照を含む、血液製剤サンプルの品質を評価するためのキットに関する。

【0080】

本明細書中で使用される用語「キット」は、好ましくは別々にまたは単一容器中で提供される、前述の構成成分のコレクションを指す。この容器は、本発明の方法を実施するた

50

めの使用説明書も含む。これらの使用説明書は、マニュアルの形式であり得る。好ましくは、使用説明書は、品質評価を確立する方法の説明書であり、最も好ましくは、使用者が品質評価を確立することを可能とする使用説明書を包含する。前記使用説明書は、コンピューターまたはデータ処理デバイス上に実装される場合、好ましくは、本発明の方法において言及される比較を実施し得るコンピュータープログラムコードにより、サンプルの品質評価を確立するために提供される。上記コンピュータープログラムコードは、光学的保存媒体(例えば、コンパクトディスク)などのデータ保存媒体またはデバイス上に提供することもできるし、コンピューターまたはデータ処理デバイス上に直接提供することもできる。別の実施形態において、上記の容器は、本発明の方法を実施するための使用説明書を含まない;このように、好ましい実施形態において、上記キットは、好ましくは、別々にまたは単一容器内で提供される、前述の構成成分のコレクションである。さらに、上記キットは、好ましくは、本明細書中上記に定義されるバイオマーカー毎の参照のための少なくとも1つの標準(すなわち参考量を表す、少なくとも1つのバイオマーカーの所定の量を有する溶液)を含むべきである。このような標準は、例えば、十分な品質または不十分な品質のサンプルまたは複数サンプルに由来するバイオマーカーの量を表し得る。好ましい実施形態において、上記キットは、少なくとも、パネル3\_a、13\_a、15\_a、16\_a、1\_a、1\_b、10\_a、11\_a、12\_a、13\_b、14\_a、14\_b、17\_b、18\_b、19\_a、19\_b、2\_b、20\_b、3\_b、4\_a、5\_a、5\_b、6\_a、7\_a、7\_b、8\_b、1、2、3、4、5、6、7、8、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、3\_m、6\_m、10\_m、15\_m、16\_m、17\_m、18\_m、19\_m、または20\_mのマーカーに対する少なくとも1つの検出剤を含む。

10

20

30

40

## 【0081】

バイオマーカーをベースとして検出剤を製造し得る方法は当業者に周知である。例えば、少なくとも1つのバイオマーカーに特異的に結合する抗体またはアプタマーを製造することができる。同様に、例えばGCMSにより分析される場合、バイオマーカー自体をキットにおいて参照として(例えば複合体中でまたは改変形態もしくは誘導体化形態で)用いることができる。マーカーが計算値である場合、検出剤は、好ましくは、前記マーカーの値を計算するために用いられる、バイオマーカーを決定するための検出剤の組み合わせであることが当業者に理解される。

## 【0082】

さらに、本発明は、十分な品質の血液製剤のコレクションまたは血液製剤サンプルを提供する方法であって、以下のステップ:

- 血液製剤のプールまたは血液製剤サンプルのプールを提供するステップ、
- 前記血液製剤のプールの各メンバーのサンプルまたは前記血液製剤サンプルのプールの各メンバーに、本発明の血液製剤サンプルの品質を評価する方法のステップを実施するステップ、
- 不十分な品質が評価される場合には血液製剤または血液製剤サンプルを廃棄し、および/または不十分な品質が評価される場合には血液製剤または血液製剤サンプルをさらなる使用から除外し;これにより十分な品質の血液製剤のコレクションまたは血液製剤サンプルのコレクションを提供するステップ

を含む、上記方法に関する。

## 【0083】

本発明の十分な品質の血液製剤のコレクションを提供する方法は、好ましくはin vitro方法である。さらに、この方法は、上記に明示的に言及されるステップの他にもステップを含み得る。さらに、1つ以上の前記ステップは、自動化装置によって実施することができる。

## 【0084】

本明細書中で引用される全ての参考文献は、それらの全開示内容および本明細書中で特に言及される開示内容について、参照により本明細書に組み込まれる。

## 【0085】

上記を考慮して、以下の実施形態が好ましい:

50

## 【0086】

## 実施形態1.

血液製剤サンプルの品質を評価する方法であって、以下のステップ：

a) 前記サンプル中で、表1の少なくとも1つのパネルのマーカーの値を決定するステップ；

b) ステップa)で決定した値を対応する参照値と比較するステップ、および

c) 前記血液製剤サンプルの品質を評価するステップ

を含む、上記方法。

## 【0087】

## 実施形態2.

10

ステップa)において、マーカーである(i) グリセロール-3-リン酸、グリセレート、およびオルニチン；(ii) グリセロール-3-リン酸、グリセレート、およびヒポキサンチン；(iii) グリセロール-3-リン酸、オルニチン、およびヒポキサンチン；または(iv) グリセレート、オルニチン、およびヒポキサンチンの量が決定される、実施形態1の方法。

## 【0088】

## 実施形態3.

ステップa)において、表2の少なくとも1つのパネルのマーカーの値が決定される、実施形態1の方法。

## 【0089】

## 実施形態4.

20

ステップa)において、表2のパネル3、13、15、18、19、または20のうちの少なくとも1つのマーカーの値が決定される、実施形態1～3のいずれか1つの方法。

## 【0090】

## 実施形態5.

血液製剤サンプルの品質を評価するステップが、前記血液製剤サンプルが交絡因子である(i) 静脈切開と血液細胞からの血漿の分離との間の長時間、(ii) 静脈切開と血液細胞からの血漿の分離との間の増加温度、(iii) 血漿の長時間の保存、および(iv) 血漿の保存中の増加温度、のいずれかによる影響を受けていないことを保証するステップである、実施形態1～4のいずれか1つの方法。

## 【0091】

30

## 実施形態6.

不十分な品質の血液製剤サンプルが同定される場合、前記方法が、前記サンプルが血液処理に関連する交絡因子により、または血漿処理に関連する交絡因子により損なわれているか否かを識別するさらなるステップを含む、実施形態1～5のいずれか1つの方法。

## 【0092】

## 実施形態7.

前記血液処理に関連する交絡因子が、(i) 静脈切開と血液細胞からの血漿の分離との間の長時間、(ii) 静脈切開と血液細胞からの血漿の分離との間の増加温度である、実施形態6の方法。

## 【0093】

40

## 実施形態8.

前記血漿処理に関連する交絡因子が、(i) 血漿の長時間の保存、および(ii) 血漿の保存中の増加温度である、実施形態6または7の方法。

## 【0094】

## 実施形態9.

ステップa)において、付加的にマーカーであるエチレンジアミン四酢酸(EDTA)、シトレート、およびアスパルテートの量を決定し、ステップb)において、前記付加的なマーカーの量を対応する参照値に対して比較する、実施形態1～8のいずれか1つの方法。

## 【0095】

## 実施形態10.

50

血液製剤サンプルの品質を評価するステップが、前記サンプルが、採血管選択に関する因子により損なわれているか否かを識別するステップをさらに含む、実施形態9の方法。

【0096】

実施形態11.

前記参照値が、以下の条件：(i) 採血と18 ~ 22 の温度での遠心分離との間の60分以内の血液処理、および(ii) 5 未満の温度における30分未満の血漿の保存、および(iii) -80 未満の温度における1年未満の血漿の保存、により処理されたサンプル中のマーカーの値を決定することによって得られる、実施形態1~10のいずれか1つの方法。

【0097】

実施形態12.

前記血液製剤サンプルが、血液サンプルまたは血漿サンプルである、実施形態1~11のいずれか1つの方法。

【0098】

実施形態13.

前記マーカーの値を決定するステップが、少なくとも1つの、好ましくは全ての前記マーカーを酵素(1つまたは複数)と反応させるステップを含む、実施形態1~12のいずれか1つの方法。

【0099】

実施形態14.

前記マーカーの値を決定するステップが、質量分析(MS)法を含む、実施形態1~12のいずれか1つの方法。

【0100】

実施形態15.

前記マーカーの値を決定するステップが、固相抽出(SPE)と液体クロマトグラフィー(LC)および質量分析(MS)との組み合わせ、好ましくはSPE-LC-MS/MSまたはSPE-超高速液体クロマトグラフィー(UPLC)-MS/MSを含む、実施形態1~12および14のいずれか1つの方法。

【0101】

実施形態16.

前記マーカーの値を決定するステップが、LCと質量分析との組み合わせ、好ましくはLC-MS/MSを含む、実施形態1~12および14のいずれか1つの方法。

【0102】

実施形態17.

前記マーカーの値を決定するステップが、ガスクロマトグラフィー(GC)と質量分析(MS)との組み合わせ、好ましくはGC-MSまたはGC-MS/MSを含む、実施形態1~12および14のいずれか1つの方法。

【0103】

実施形態18.

少なくとも1つの前記マーカー、好ましくは全ての前記マーカーの内部標準を決定するステップをさらに含む、実施形態1~17のいずれか1つの方法。

【0104】

実施形態19.

少なくとも1つの前記マーカー、好ましくは全ての前記マーカーの外部標準を決定するステップをさらに含む、実施形態1~18のいずれか1つの方法。

【0105】

実施形態20.

前記マーカーの値を決定するステップが、前記マーカーの量を決定するステップであるか、またはマーカーの少なくとも1つの濃度値から誘導される計算値、好ましくは少なくとも2つのバイオマーカーの濃度の比を決定するステップである、実施形態1~19のいずれか1つの方法。

10

20

30

40

50

## 【0106】

実施形態21.

前記マーカーの個々の数値が、多変量モデル、好ましくはロジスティック回帰モデルを用いることにより組み合わせ値に変換される、実施形態1～20のいずれか1つの方法。

## 【0107】

実施形態22.

前記ステップb)が、以下のステップ：

b1) ステップa)において言及される前記マーカーの決定値に基づいて組み合わせ値を計算するステップであって、好ましくは前記組み合わせ値の計算において上記マーカーがそれらの重要性によって重みづけされる、上記ステップ；および

b2) このようにして計算された組み合わせ値を参照組み合わせ値に対して比較するステップ

を含む、実施形態1～21のいずれか1つの方法。

## 【0108】

実施形態23.

前記ステップb)が、以下のステップ：

b1) ステップa)で決定した値を対応する参照値と比較し、前記比較に基づいて組み合わせ値を計算するステップであって、好ましくは前記組み合わせ値の計算において該マーカーがそれらの重要性によって重みづけされる、前記ステップ；および

b2) このようにして計算された組み合わせ値を参照組み合わせ値に対して比較するステップ

を含む、実施形態1～21のいずれか1つの方法。

## 【0109】

実施形態24.

前記血液製剤サンプルの品質を評価するステップが、サンプルの数値的品質評価を確立するステップであり、またここで前記マーカーの前記値が、所定のカットオフ値に対する比較によって分類される、実施形態1～23のいずれか1つの方法。

## 【0110】

実施形態25.

所定のカットオフ値に対する比較によって分類される前記マーカーが単一値にまとめられ、この単一値が次いでスケール化され、好ましくは前記スケーリングにおいて、上記マーカーがそれらの重要性によって重みづけされる、実施形態24の方法。

## 【0111】

実施形態26.

少なくともパネル3\_a、13\_a、15\_a、16\_a、1\_a、1\_b、10\_a、11\_a、12\_a、13\_b、14\_a、14\_b、17\_b、18\_b、19\_a、19\_b、2\_b、20\_b、3\_b、4\_a、5\_a、5\_b、6\_a、7\_a、7\_b、8\_b、1、2、3、4、5、6、7、8、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、3\_m、6\_m、10\_m、15\_m、16\_m、17\_m、18\_m、19\_m、または20\_mのマーカーの値を決定するステップを含む、実施形態1～25のいずれか1つの方法。

## 【0112】

実施形態27.

血液製剤サンプルの品質を評価するためのデバイスであって、以下のもの：

a) 少なくとも、表1、表2、または表2aの少なくとも1つのパネルのマーカーに対する少なくとも1つの検出器を含む前記サンプルの分析ユニットであって、前記少なくとも1つの検出器が前記サンプル中の前記マーカーの量を決定する、上記分析ユニット；およびそれに機能的に連結されている、

b) データ処理ユニットとデータベースとを含む評価ユニットであって、前記データベースは保存された対応する参照値を含み、前記データ処理ユニットは、2つのバイオマーカーのサンプル内比を計算し、分析ユニットにより決定されたマーカーの値または評価ユニットにより計算された値を前記保存された参照値に対して比較し、それに基づいて品質

10

20

30

40

50

の評価が確立される出力情報を生成する、実体的に埋め込まれたアルゴリズムを任意選択で有する、上記評価ユニットを含む、上記デバイス。

【0113】

実施形態28

前記分析ユニットが、(i) 少なくとも、マーカーであるグリセロール-3-リン酸、グリセレート、およびオルニチンの；(ii) 少なくとも、マーカーであるグリセロール-3-リン酸、グリセレート、およびヒポキサンチンの；(iii) 少なくとも、マーカーであるグリセロール-3-リン酸、オルニチン、およびヒポキサンチンの；(iv) 少なくとも、マーカーであるグリセレート、オルニチン、およびヒポキサンチンの少なくとも1つの検出器；または(v) 少なくとも、マーカーであるグルタミン、グリセロール-3-リン酸、グルタミン酸塩、およびヒポキサンチンの少なくとも1つの検出器を含み、前記少なくとも1つの検出器が前記サンプル中の前記マーカーの量を決定する、実施形態27のデバイス。

10

【0114】

実施形態29.

前記分析ユニットが、少なくとも、パネル3\_a、13\_a、15\_a、16\_a、1\_a、1\_b、10\_a、1\_1\_a、12\_a、13\_b、14\_a、14\_b、17\_b、18\_b、19\_a、19\_b、2\_b、20\_b、3\_b、4\_a、5\_a、5\_b、6\_a、7\_a、7\_b、8\_b、1、2、3、4、5、6、7、8、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、3\_m、6\_m、10\_m、15\_m、16\_m、17\_m、18\_m、19\_m、または20\_mのマーカーの少なくとも1つの検出器を含む、実施形態26または27のデバイス。

20

【0115】

実施形態30.

血液製剤サンプルの品質を評価するための、少なくとも、表1、表2、または表2aの少なくとも1つのパネルのマーカーまたはそれらの検出剤もしくは検出試薬の使用。

【0116】

実施形態31.

前記パネルが、(i) グリセロール-3-リン酸、グリセレート、およびオルニチン；(ii) グリセロール-3-リン酸、グリセレート、およびヒポキサンチン；(iii) グリセロール-3-リン酸、オルニチン、およびヒポキサンチン；(iv) グリセレート、オルニチン、およびヒポキサンチン；または(v) グルタミン、グリセロール-3-リン酸、グルタミン酸塩、およびヒポキサンチンを含む、実施形態30の使用。

30

【0117】

実施形態32.

前記少なくとも1つのパネルが、パネル3\_a、13\_a、15\_a、16\_a、1\_a、1\_b、10\_a、11\_a、12\_a、13\_b、14\_a、14\_b、17\_b、18\_b、19\_a、19\_b、2\_b、20\_b、3\_b、4\_a、5\_a、5\_b、6\_a、7\_a、7\_b、8\_b、1、2、3、4、5、6、7、8、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、3\_m、6\_m、10\_m、15\_m、16\_m、17\_m、18\_m、19\_m、または20\_mである、実施形態30または31の使用。

【0118】

実施形態33.

ハウジング中に含まれる、少なくとも、表1の少なくとも1つのパネルのマーカーの少なくとも1つの検出剤、および/または前記マーカーの参照を含む、血液製剤サンプルの品質を評価するためのキット。

40

【0119】

実施形態34.

前記パネルが、(i) グリセロール-3-リン酸、グリセレート、およびオルニチン；(ii) グリセロール-3-リン酸、グリセレート、およびヒポキサンチン；(iii) グリセロール-3-リン酸、オルニチン、およびヒポキサンチン；(iv) グリセレート、オルニチン、およびヒポキサンチン；または(v) グルタミン、グリセロール-3-リン酸、グルタミン酸塩、およびヒポキサンチンを含む、実施形態33のキット。

50

## 【0120】

## 実施形態35.

上記キットが、少なくとも、パネル3\_a、13\_a、15\_a、16\_a、1\_a、1\_b、10\_a、11\_a、12\_a、13\_b、14\_a、14\_b、17\_b、18\_b、19\_a、19\_b、2\_b、20\_b、3\_b、4\_a、5\_a、5\_b、6\_a、7\_a、7\_b、8\_b、1、2、3、4、5、6、7、8、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、3\_m、6\_m、10\_m、15\_m、16\_m、17\_m、18\_m、19\_m、または20\_mのマーカーの少なくとも1つの検出剤を含む、実施形態33または34のキット。

## 【0121】

## 実施形態36.

十分な品質の血液製剤のコレクションを提供する方法であって、以下のステップ：

10

a) 血液製剤のコレクションを提供するステップ、

b) 前記血液製剤のコレクションの各メンバーのサンプルに、実施形態1～26のいずれか1つの血液製剤サンプルの品質を評価する方法のステップを実施するステップ、

c) 不十分な品質が評価される場合には血液製剤を廃棄し、および/または不十分な品質が評価される場合には血液製剤をさらなる使用から除外し；これにより十分な品質の血液製剤のコレクションを提供するステップ

を含む、上記方法。

## 【0122】

## 実施形態37.

血液製剤サンプルの十分な品質または不十分な品質を示す、少なくとも、表1、表2、または表2aの少なくとも1つのパネルのマーカーの特性値を含むデータコレクション。

20

## 【0123】

## 実施形態38.

少なくとも、パネル3\_a、13\_a、15\_a、16\_a、1\_a、1\_b、10\_a、11\_a、12\_a、13\_b、14\_a、14\_b、17\_b、18\_b、19\_a、19\_b、2\_b、20\_b、3\_b、4\_a、5\_a、5\_b、6\_a、7\_a、7\_b、8\_b、1、2、3、4、5、6、7、8、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、3\_m、6\_m、10\_m、15\_m、16\_m、17\_m、18\_m、19\_m、または20\_mのマーカーの特性値を含む、実施形態37のデータコレクション。

## 【0124】

## 実施形態39.

30

実施形態37または38のデータコレクションを含むデータ保存媒体。

## 【0125】

## 実施形態29.

以下のもの：

(a) (b)に機能的に連結されている、サンプルの少なくとも1つのバイオマーカーの特性値を比較する手段

(b) 実施形態39によるデータ保存媒体

を含むシステム。

## 【実施例】

## 【0126】

以下の実施例は、本発明を単に例示するものである。これらの実施例は、いかなる場合も、本発明の範囲を限定するものと解されるべきではない。

40

## 【0127】

実施例1：血漿の前処理に関する、高品質なサンプルおよび低品質なサンプルの作製の実験的設計

この実験は、血液血漿バイオバンク検体の品質管理用多変量バイオマーカーを同定するための血漿処理の時間および温度に関する、高品質なヒト血漿サンプルおよび低品質なヒト血漿サンプルを作製するために設計された。2時間以内に血液から血漿へと処理されたサンプルのEDTA血漿プールを、保存中 -80°で連続的に保持し、保存中に解凍および再凍結されなかったものをこの実験に使用した。このプールを1mlアリコートに分割し、これ

50

らを4、12および21の温度でインキュベートした。0時間、0.5時間、5時間および16時間の時点で、それぞれ10個のアリコートを80で凍結し、実施例4に記載されるとおりに分析した(実施例1ではスフィンゴ脂質は分析しなかった)。血漿サンプルを無作為分析シーケンス設計で分析した。プロセスの変動性を説明するため、生ピークデータを分析シーケンス毎に全サンプルの中央値に対して正規化した(いわゆる「比」)。半定量的データの実験-包括アライメントを可能とするため、上記の実験においてMxPool(商標)(代謝プロファイリング研究のアライメントに適した市販のヒトEDTA血漿の大プール)を12個の複製サンプルで分析し、比をさらにMxPool(商標)サンプルの中央値に対して正規化した(すなわち、この研究から得られた比は同レベルであり、従って、同じMxPool(商標)の他のアリコートに対して正規化された、他のプロジェクトから得られたデータと同等である)。標準化法(エイコサノイド、カテコールアミン)から得られた総定量データは、それらの絶対定量データのままであった。データをlog10変換して正規分布に近づけた。

10

## 【0128】

任意の温度で0時間または0.5時間処理されたサンプルは高品質と見なされ；任意の温度で16時間処理されたサンプルは低品質と見なされ；21で5時間処理されたサンプルは低品質と見なされ；このアプローチにおいて、全ての他のサンプルは無視した。

## 【0129】

実施例2：血液の血漿への処理に関する、高品質なサンプルおよび低品質なサンプルの作製の実験的設計。

20

この実験は、血液血漿バイオバンク検体の品質管理用多変量バイオマーカーを同定するための血液の血漿への前処理中に生じる分析前交絡因子に関する、高品質なヒト血漿サンプルおよび低品質なヒト血漿サンプルを作製するために設計された。

## 【0130】

異なる群の血液の取扱いは、以下の手順を含んでいた：

- ・0における長時間インキュベーション
- ・室温における長時間インキュベーション
- ・溶血

## 【0131】

20人の健康なボランティア(13人の女性、7人の男性)を採用し、ゲージ20のセーフティフライ(safety-fly)血液回収システムを用いる静脈穿刺により、64mlの血液を採血して3つの9-ml-K3EDTAモノベットに回収し、続いて1mlをニュートラルモノベットに(サンプルは廃棄した)、続いて9-ml-ニュートラルモノベットに、続いて3つの9-ml-K3EDTAモノベットに回収した。溶血を阻止するため、モノベットを反転させることによって穏やかに混合した。K3EDTAモノベットを開け、各被験体内でプールした。

30

## 【0132】

各被験体の血液を、以下のように異なる群内で処理した：

## 【0133】

0における長時間インキュベーション

2x5mlの血液プールを、0で4時間および6時間、それぞれインキュベートした。この時間後、血漿を、冷却遠心機中で1500 x gにて15分の遠心分離により調製した。血漿を分析まで-80で保存した。

40

## 【0134】

室温における長時間インキュベーション

5mlの血液プールを室温で1時間インキュベートした。この時間後、血漿を、冷却遠心機中で1500 x gにて15分の遠心分離により調製した。血漿を分析まで-80で保存した。

## 【0135】

溶血

2x6mlの血液プールを、ゲージ25針(グレード1溶血)およびゲージ27針(グレード2溶血)を有するシリンジにそれぞれ通過させた。血漿を、冷却遠心機中で1500 x gにて15分の遠心分離により調製した。血漿を分析まで-80で保存した。

50

## 【0136】

## 対照

対照群としての役割を果たすサンプルを、遅滞なく直ぐに処理した。残りの血液プールを、冷却遠心機中で $1500 \times g$ にて15分遠心分離した。上部の血漿上清を抜き出し、遠心分離管中で混合した。この血漿サンプルのアリコートを凍結し、分析まで-80で保存して対照として役立てた。

## 【0137】

この実験の血漿サンプルを、無作為分析シーケンス設計において実施例4に記載されるとおりに分析した。代謝産物プロファイリングは、半定量的分析プラットフォームを提供し、規定の参照群に対する相対代謝産物レベルをもたらす(「比」)。このコンセプトを裏付け、さらにまた異なる分析バッチ(「実験」)のアライメントも可能とするため、2つの異なる参照サンプルタイプを、全プロセスを通して並行して実施した。第1に、プロジェクトプールを全サンプルのアリコートから作製し、各分析シーケンス内で4個の複製を用いて測定した。全ての半定量的分析代謝産物について、データを各分析シーケンス内のプール参照サンプルにおける中央値に対して正規化し、プール-正規化比を与えた(代謝産物毎に各サンプルについて実施した)。これは、機器間変動および機器内変動を補償した。第2に、実験において、MxPool(商標)を12個の複製サンプルで分析し、プール-正規化比をMxPool(商標)サンプルの中央値に対してさらに正規化した(すなわち、この研究から得られた比は同レベルであり、従って同じMxPool(商標)の他のアリコートに対して正規化される他のプロジェクトから得られたデータと同等である)。標的化法(エイコサノイド、カテーテルアミン)から得られる総定量データは、それらの絶対定量データのままである。

10

20

30

## 【0138】

対照群のサンプルは高品質であると見なされ、この実験から得られた他のサンプルは低品質であると見なされる。

## 【0139】

実施例3：血漿の長期保存に関する、高品質なサンプルおよび低品質なサンプルの作製の実験的設計

この実験は、血液血漿バイオバンク検体の品質管理用多変量バイオマーカーを同定するための血漿の長期保存に関する、高品質なヒト血漿サンプルおよび低品質なヒト血漿サンプルを作製するために設計された。EDTA血漿プールのアリコートを、4 または -20 もしくは -80 、あるいは液体窒素中でそれぞれ保持した。1日後、5日後、55日後、181日後、および365日後、各温度で保存されたサンプルの4個のアリコートを、実施例4に記載されるとおりに代謝産物プロファイリングによって分析した(実施例3ではスフィンゴ脂質は分析しなかった)。さらに、20 で保持されたサンプルを $t=0$ および1日後に分析した。血漿サンプルを、無作為分析シーケンス設計において分析した。プロジェクトプールを全サンプルのアリコートから作製し、各分析シーケンス内で4個の複製を用いて測定した。プロセスの変動性を説明するため、生ピークデータを、分析シーケンス毎のプロジェクトプールの中央値に対して正規化した(いわゆる「比」)。比を $\log_{10}$ 変換してデータの正規分布に近づけた。

40

## 【0140】

-80 または液体窒素中で保存されたサンプルは、いかなる保存時間でも高品質サンプルと見なされた。さらに、 $t=0$ で分析されたサンプルまたは -20 で1日間保存されたサンプルは、高品質サンプルと見なされた。

## 【0141】

4 で保存されたサンプルは、いかなる保存時間でも低品質サンプルと見なされた。 -20 で保存されたサンプルは、55日間以上保存された場合に低品質サンプルと見なされた。他のサンプルは無視した。

## 【0142】

## 実施例4：MS分析のためのサンプル調製

以下に記載されるとおり、ヒト血漿サンプルを調製し、LC-MS/MSおよびGC-MSまたはSPE

50

-LC-MS/MS(ホルモン)分析に供した。タンパク質を沈殿により血液血漿から分離し、特に中性バッファーをサンプルに添加し、適切な沈殿溶媒を用いて、タンパク質を沈殿により血液血漿から分離した。水およびエタノールとジクロロメタンとの混合物の添加後、特に遠心分離により残りのサンプルを水性極性相と有機親油性相に分画した。

## 【0143】

脂質抽出物のトランスメタノリシスのために、140  $\mu$ lのクロロホルム、37  $\mu$ lの塩酸(水中37重量%HCl)、320  $\mu$ lのメタノールおよび20  $\mu$ lのトルエンの混合物を蒸発抽出物に添加した。容器を密封し、振盪しながら100℃で2時間加熱した。この溶液をその後蒸発乾固させた。残渣を完全に乾燥させた。

## 【0144】

カルボニル基のメトキシム化は、密封容器中でメトキシアミン塩酸塩との反応(ピリジン中20mg/ml、100℃を60℃で1.5時間)により実施した。20  $\mu$ lの奇数直鎖脂肪酸の溶液(各0.3mg/mLの7~25個の炭素原子の脂肪酸と各0.6mg/mLの27、29および31個の炭素原子を有する脂肪酸との3/7(v/v)ピリジン/トルエン中溶液)を時間基準として添加した。最後に、100  $\mu$ lのN-メチル-N-(トリメチルシリル)-2,2,2-トリフルオロアセトアミド(MSTFA)による誘導体化を、再び密封容器中で60℃で30分間実施した。GCへの注入前の最終体積は220  $\mu$ lであった。

## 【0145】

極性相については、誘導体化は以下の方法で実施した：カルボニル基のメトキシム化を、密封容器中でメトキシアミン塩酸塩との反応(ピリジン中20mg/ml、50℃を60℃で1.5時間)により実施した。10  $\mu$ lの奇数直鎖脂肪酸の溶液(各0.3mg/mLの7~25個の炭素原子の脂肪酸と各0.6mg/mLの27、29および31個の炭素原子を有する脂肪酸との3/7(v/v)ピリジン/トルエン中溶液)を時間基準として添加した。最後に、50  $\mu$ lのN-メチル-N-(トリメチルシリル)-2,2,2-トリフルオロアセトアミド(MSTFA)による誘導体化を、再び密封容器中で60℃で30分間実施した。GCへの注入前の最終体積は110  $\mu$ lであった。

## 【0146】

上記のメトキシム化反応に含まれる奇数直鎖脂肪酸は、GCの時間標準として含まれ、正確なピークアノテーションの確認を裏付ける。特に、少数のマーカー(例えば本発明のパネルのマーカー)が分析される場合、前記時間標準は、絶対的に必要であるわけではない。

## 【0147】

GC-MSシステムは、Agilent 5973 MSDに連結されたAgilent 6890 GCで構成される。オートサンプラーはCTC社製のCompiPalまたはGCPalである。

## 【0148】

分析のため、分析対象のサンプル物質および相分離ステップから得られる画分に応じて、0%~35%の芳香族部分を含む異なるポリ-メチル-シロキサン固定相を有する通常の市販のキャビラリー分離カラム(30m x 0.25mm x 0.25  $\mu$ m)を使用した(例えば：DB-1ms, HP-5ms、DB-XLB、DB-35ms、Agilent Technologies社)。1  $\mu$ Lまでの最終体積をスプリットレス注入し、オープン温度プログラムは、十分なクロマトグラフィー分離および各分析物ピーク内の走査数を達成するため、サンプル物質および相分離ステップから得られる画分に応じて異なる加熱速度を用いて70℃で開始して340℃で終了した。さらに、RTL(Retention Time Locking、Agilent Technologies社)を分析に使用し、通常のGC-MS標準条件は、例えば名目上1~1.7ml/minの定常流および移動相ガスとしてのヘリウムであり、イオン化は70eVの電子衝撃で実施し、2.5~3走査/秒の走査速度で15~600のm/z範囲内で走査し、標準調整条件であった。

## 【0149】

HPLC-MSシステムは、API 4000質量分析計(Applied Biosystem/MDS SCIEX社、トロント、カナダ)に連結されたAgilent 1100 LCシステム(Agilent Technologies社、ウォルドブロン、ドイツ)で構成されていた。HPLC分析は、C18固定相(例えば：GROM ODS 7 pH, Thermo Betasil C18)を有する市販の逆相分離カラムで実施した。蒸発させて再構成された極

10

20

30

40

50

性相および親油相の10  $\mu$ Lまでの最終サンプル体積を注入し、メタノール/水/ギ酸勾配またはアセトニトリル/水/ギ酸勾配を200  $\mu$ L/分の流速で用いる勾配溶出で分離を実施した。

#### 【0150】

質量分析は、多重反応モニタリング-(MRM)-モードおよび100 ~ 1000amuのフルスキャンを用いて、非極性画分についてはポジティブモードの、また極性画分についてはネガティブモードもしくはポジティブモードのエレクトロスプレーイオン化によって実施した。

#### 【0151】

血漿サンプル中のカテコールアミンの分析：

カテコールアミンおよびそれらの代謝産物を、オンラインSPE-LC-MSにより、Yamadaら (Yamada H, Yamahara A, Yasuda S, Abe M, Oguri K, Fukushima S, Ikeda-Wada S : Dansyl chloride derivatization of methamphetamine : a methode with advantages for screening and analysis of methamphetamine in urine. Journal of Analytical Toxicology, 26(1) : 17-22 (2002))により記載されるとおりに測定した。

#### 【0152】

血漿サンプル中のエイコサノイドの分析：

エイコサノイドおよび関連化合物を、血漿から、オフライン-およびオンライン-SPE LC-MS/MS(固相抽出-LC-MS/MS)(Masoodi M およびNicolaou A : Rapid Commun Mass Spectrom. 2006 ; 20(20) : 3023-3029)によって測定した。絶対的定量を、安定アイソトープ標識標準を用いて実施した。

10

20

30

40

50

#### 【0153】

血漿サンプル中のスフィンゴイドの分析：

好みの方法において、サンプルのオフラインSPEクリーンアップによりスフィンゴイドを測定し、その後UHPLC-MS/MSにより半定量的に決定した：Oasis(登録商標)親水性-親油性-バランス化  $\mu$  溶出 SPEカートリッジ(Waters社)を、n-ヘキサン、メタノールおよびメタノール/リン酸で調整した。血漿サンプルの適用後、アセトニトリル/イソプロパノールによるスフィンゴイドの溶出前にカートリッジをメタノール/リン酸で洗浄した。サンプルは、UHPLC-MS/MSシステムに直接注入した。

#### 【0154】

あるいは、代謝産物は、較正曲線または安定アイソトープ標識内部標準のいずれかを用いる標的化定量的質量分析ベースのアッセイにおいて分析される。この場合、サンプル調製(タンパク質沈殿、極性画分と脂質画分の分離、および適用可能であれば誘導体化)は上記のとおりに行われる。標的化代謝産物の検出のため、選択イオンモニタリング(SIM)モードまたは選択反応モニタリング(SRM)モードにおいて質量分析が実施される。

#### 【0155】

実施例5：統計的データ分析

ソフトウェアR 2.8.1(パッケージnime)をデータ分析および可視化に使用した。ランダムフォレスト(Random Forest)(LiawおよびWiener (2002). Classification and Regression by random Forest. R News 2(3), 18-22.)およびエラスティックネット(Elastic net)(ZouおよびHastie (2005) Regularization and variable selection via the elastic net, Journal of the Royal Statistical Society, Series B)による分類分析をlog10変換データ上で行った。代謝産物の最終セットは、技術的態様(サンプル分析方法設定(例えばMSベースの方法または酵素的試験ベースのアッセイ)においてどのバイオマーカーパネルと一緒に分析することができるかを意味する)を考慮することにより；または可能な限り多数の分析前交絡因子に対処する能力に関して；または分析前領域についての特定の焦点(例えば、血液の血漿への処理または長期保存)に関して；またはマトリックスチェックについての特定の焦点に関して；または最小アプローチに関して(可能な限り少数の代謝産物を意味する)決定した。8つの代謝産物についてサンプル内比を計算したが、これはプロジェクトプールに対する比またはMxPool(商標)に対する比の代わりにまたは付加的に、各サンプル中でそれぞれ2つの代謝産物の指標が計算され、分析されることを意味している

。このサンプル内比が、個別間変動を説明する。

【0156】

得られた分類指標は、実施例1～3の全混合データ上に再教育(retrain)した。本発明者らは、高品質サンプルに対して低品質サンプルを分析した。本発明者らの選択パネルの性能を分析するため、これらの代謝産物のセットを用いてランダムフォレスト分析またはエラスティックネット分析により分類指標を構築し、交差検証分類性能は、受信者動作特性(ROC)分析の曲線下面積(AUC)を用いて推定した。代謝産物ベースラインレベルへの実験特異的な影響に関して、代謝産物データの前ANOVA補正を用いてまたは用いずに性能計算を実施した。

【0157】

実施例6：パネル選択基準

品質マーカーのパネルを、高品質サンプルと低品質サンプルを分類するそれらの診断性能、それらの品質管理対象、異なる分析方法によるそれらのアッセイ可能性、それらのヒト血漿中での濃度、空腹、年齢および性別のような一般的な変動要素に関するそれらの変動性、ならびに臨床性能検証試験におけるそれらの再現性および診断性能に基づいて選択した。

【0158】

実施例7：単一マーカーの性能

单一マーカーとしての様々な代謝産物を用いて得られたAUC値は、表3に示される。採血管関連交絡因子について、上記に示されるとおり、EDTA血漿を参照として使用した。

【0159】

10

20

【表3】

表3：個々の代謝産物についての受信者動作特性の単変量AUC値

対象	バイオマーカー (代謝産物(1つまたは複数))	方向	AUC
血漿処理関連交絡因子	11-ヒドロキシエイコサテトラエン酸 (C20:シス[5,8,12,14]4)	上昇	0.5326
血液処理関連交絡因子	12-ヒドロキシエイコサテトラエン酸 (C20:シス[5,8,10,14]4)	下降	0.5087
血液処理関連交絡因子、 血漿処理関連交絡因子	12-ヒドロキシヘプタデカトリエン酸 (C17:[5,8,10]3)	下降、 上昇	0.5385
血液処理関連交絡因子	13-ヒドロキシオクタデカジエン酸 (13-HODE)(C18:シス[9]トランス[11]2)	上昇	0.5053
血漿処理関連交絡因子	15-ヒドロキシエイコサテトラエン酸 (C20:シス[5,8,11,13]4)	上昇	0.5379
血漿処理関連交絡因子	3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸 (DOPAC)	下降	0.7537
血漿処理関連交絡因子	3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン (DOPA)	下降	0.6501
血漿処理関連交絡因子	3,4-ジヒドロキシフェニルグリコール (DOPEG)	下降	0.8895
血漿処理関連交絡因子	3-ホスホグリセレート (3-PGA)	上昇	0.71
血漿処理関連交絡因子	5-ヒドロキシエイコサテトラエン酸 (C20:トランス[6]シス[8,11,14]4) (5-HETE)	上昇	0.5322
血漿処理関連交絡因子	8,9-ジヒドロキシエイコサトリエン酸 (C20:シス[5,11,14]3)	上昇	0.5349
血漿処理関連交絡因子	8-ヒドロキシエイコサテトラエン酸 (C20:トランス[5]シス[9,11,14]4) (8-HETE)	上昇	0.5751
血漿処理関連交絡因子	9-ヒドロキシオクタデカジエン酸 (9-HODE) (C18:トランス[10]シス[12]2)	上昇	0.5415
血漿処理関連交絡因子	アドレナリン(エピネフリン)	下降	0.7327
血漿処理関連交絡因子	アラニン	上昇	0.5897
血液処理関連交絡因子	アルギニン	下降	0.5951
血液処理関連交絡因子	アルギニン	下降	0.5747
血漿処理関連交絡因子	アスパラギン	下降	0.506
採血管	アスパルテート	上昇	0.5164
血漿処理関連交絡因子	アスパルテート/アスパラギン サンプル内比	上昇	0.5926
血漿処理関連交絡因子	セラミド(d18:1,C24:0)	上昇	0.5414
血漿処理関連交絡因子	コレステリルエステルヒドロペルオキシド(C18:2-9-OOH)、 コレステリルエステルヒドロペルオキ	上昇	0.7213

10

20

30

40

	シド(C20:4-OOH)、 コレステリルエステルヒドロペルオキシド(C18:2-13-OOH)		
採血管	シトレーント	上昇	0.681
血液処理関連交絡因子	シトルリン	上昇	0.5201
血液処理関連交絡因子	クレアチニン	上昇	0.5785
血漿処理関連交絡因子	システイン	下降	0.7206
血漿処理関連交絡因子	シスチン	下降	0.7023
採血管	エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)	下降	na
血液処理関連交絡因子	グルコース	下降	0.7584
血液処理関連交絡因子	グルコース-6-リン酸	上昇	0.697
血漿処理関連交絡因子	グルタメート	上昇	0.5399
血漿処理関連交絡因子	グルタメート/グルタミン サンプル内比	上昇	0.6667
血漿処理関連交絡因子	グルタミン	下降	0.7344
血漿処理関連交絡因子	グリセレート	上昇	0.5541
血漿処理関連交絡因子	グリセロール-3-リン酸	上昇	0.5843
血液処理関連交絡因子	ヒボキサンチン	上昇	0.6212
血液処理関連交絡因子	ラクテート	上昇	0.517
血液処理関連交絡因子	ラクテート/グルコース サンプル内比	上昇	0.5484
血漿処理関連交絡因子	リゾホスファチジルコリン (C17:0)	上昇	0.5873
血漿処理関連交絡因子	リゾホスファチジルコリン (C18:0)	上昇	0.5207
血漿処理関連交絡因子	リゾホスファチジルコリン (C18:1)	上昇	0.555
血漿処理関連交絡因子	リゾホスファチジルコリン (C20:4)	上昇	0.5008
血液処理関連交絡因子	マルトース	上昇	0.6564
血液処理関連交絡因子	マルトトリオース	上昇	0.8762
血漿処理関連交絡因子	ノルアドレナリン (ノルエピネフリン)	下降	0.9047

10

20

30

40

血液処理関連交絡因子	オルニチン	上昇	0.5837
血液処理関連交絡因子	オルニチン/アルギニン サンプル内比	上昇	0.5165
血液処理関連交絡因子	ペントース	上昇	0.5349
血漿処理関連交絡因子	ホスファチジルコリンヒドロペルオキシド (C16:0,C18:1-OOH)	上昇	0.695
血漿処理関連交絡因子	ホスファチジルコリンヒドロペルオキシド (C16:0,C18:2-OOH)	上昇	0.614
血漿処理関連交絡因子	ホスファチジルコリンヒドロペルオキシド (C18:0,C18:2-OOH)	上昇	0.5574
血漿処理関連交絡因子	プロスタグランジン D2	上昇	0.5875
血漿処理関連交絡因子	プロスタグランジン E2	上昇	0.5868
血液処理関連交絡因子	リボース	上昇	0.5123
血液処理関連交絡因子	セロトニン (5-HT)	下降	0.6164
血液処理関連交絡因子	スフィンガジエニン (d18:2)	下降	0.6685
血液処理関連交絡因子	スフィンガジエニン-1-リン酸 (d18:2)	上昇	0.5997
血液処理関連交絡因子	スフィンゴシン (d16:1)	下降	0.8343
血液処理関連交絡因子	スフィンゴシン (d18:1)	下降	0.8904
血液処理関連交絡因子	スフィンゴシン-1-リン酸 (d16:1)	上昇	0.5284
血液処理関連交絡因子	スフィンゴシン-1-リン酸 (d17:1)	上昇	0.6247
血液処理関連交絡因子	スフィンゴシン-1-リン酸 (d18:1)	上昇	0.798
血液処理関連交絡因子	タウリン	下降	0.6343
血漿処理関連交絡因子	トレオニン	上昇	0.5448
血液処理関連交絡因子、 血漿処理関連交絡因子	トロンボキサン B2	下降、 上昇	0.6766
血漿処理関連交絡因子	トリアシルグリセリドヒドロペルオキシド (C16:0,C18:1,C18:2-OOH)	上昇	0.6769
血漿処理関連交絡因子	トリアシルグリセリドヒドロペルオキシド (C16:0,C18:1,C18:3-OOH)、 トリアシルグリセリドヒドロペルオキシド (C16:0,C18:2,C18:2-OOH)	上昇	0.6584
血漿処理関連交絡因子	トリアシルグリセリドヒドロペルオキシド (C16:0,C18:1,C20:4-OOH)、 トリアシルグリセリドヒドロペルオキシド (C18:1,C18:2,C18:2-OOH)、 トリアシルグリセリドヒドロペルオキシド (C18:1,C18:2,C18:3-OOH)	上昇	0.5225

10

20

30

40

	シド(C18:1,C18:1,C18:3-OOH)		
血液処理関連交絡因子	尿酸	上昇	0.655

## 【0160】

## 実施例8：最適化パネルの性能

上記(実施例5および6)に示される基準最適性能およびさらなる基準に基づいて、上記に特定されるとおりにパネルを選択し、表2にまとめられるパネルを得た。AUC推定値として表される前記表2のパネルの性能は、表4に示される。

10

## 【0161】

## 【表4】

表4：分析前交絡因子を検出する血漿サンプルの品質管理に適した代謝産物/マーカーパネルの性能(推定AUC値)。

パネル番号	エラスティックネット(Elastic Net)、(除くANOVA)	エラスティックネット(Elastic Net)、(含むANOVA)	ランダムフォレスト(Random Forest)、(除くANOVA)	ランダムフォレスト(Random Forest)、(含むANOVA)
1	0.90	0.94	0.99	0.99
2	0.94	0.98	0.98	0.99
3	0.90	0.97	0.99	1.00
4	0.77	0.86	0.79	0.86
5	0.74	0.78	0.84	0.89
6	0.71	0.85	0.96	0.97
7	0.73	0.50	0.78	0.77
8	0.86	0.96	0.94	0.99
9	0.69	0.67	0.79	0.75
10	0.91	0.97	0.99	0.99
11	0.89	0.97	0.98	0.99
12	0.79	0.86	0.95	0.95
13	0.88	0.96	0.96	0.98
14	0.88	0.96	0.98	0.99
15	0.90	0.96	0.98	0.99
16	0.89	0.97	0.99	1.00
17	0.92	0.99	0.98	0.99
18	0.85	0.95	0.96	0.99
19	0.75	0.95	0.95	0.98
20	0.85	0.95	0.95	0.98

20

30

40

## 【0162】

## 【表4a】

表4a：「マトリックスチェックマーカー」(パネル9)を付加的に包含する、分析前交絡因子を検出する血漿サンプルの品質管理に適した代謝産物/マーカーパネルの性能(推定AUC値)

パネル番号	エラスティックネット (Elastic Net), (除く ANOVA)	エラスティックネット (Elastic Net), (含む ANOVA)	ランダムフォレスト(Random Forest), (除く ANOVA)	ランダムフォレスト(Random Forest), (含む ANOVA)
3_m	0.90	0.97	0.99	0.99
6_m	0.77	0.85	0.97	0.96
10_m	0.91	0.97	0.99	1.00
15_m	0.90	0.97	0.98	0.99
16_m	0.89	0.97	0.99	1.00
17_m	0.92	0.99	0.99	1.00
18_m	0.88	0.95	0.96	0.99
19_m	0.83	0.95	0.97	0.99
20_m	0.87	0.95	0.97	0.99

## 【0163】

## 実施例9：サブパネルの性能

頻繁に生じるマーカーについて、表2の最適化パネルを試験した。このような頻繁に同定されるマーカーの特定の組み合わせはサブパネル(表1)にまとめることが可能であり、驚くべきことに高性能を有していた(表5)。

## 【0164】

10

20

## 【表5】

表5：分析前交絡因子を検出する、血漿サンプルの品質管理に適した最小マーカーパネルの性能(推定AUC値)。

パネル番号	AUC推定値			
	エラスティックネット(Elastic Net)、(除くANOVA)	エラスティックネット(Elastic Net)、(含むANOVA)	ランダムフォレスト(Random Forest)、(除くANOVA)	ランダムフォレスト(Random Forest)、(含むANOVA)
1_a	0.65	0.62	0.76	0.77
1_b	0.65	0.66	0.79	0.79
10_a	0.86	0.95	0.93	0.97
11_a	0.76	0.94	0.94	0.97
12_a	0.76	0.75	0.85	0.85
13_a	0.74	0.95	0.89	0.98
13_b	0.72	0.86	0.95	0.96
14_a	0.66	0.95	0.85	0.95
14_b	0.79	0.88	0.89	0.92
15_a	0.79	0.75	0.82	0.83
16_a	0.85	0.95	0.95	0.98
17_b	0.89	0.89	0.96	0.96
18_b	0.74	0.79	0.91	0.95
19_a	0.74	0.95	0.90	0.97
19_b	0.67	0.94	0.89	0.95
2_b	0.72	0.86	0.95	0.95
20_b	0.66	0.82	0.88	0.93
3_a	0.83	0.95	0.89	0.97
3_b	0.78	0.79	0.90	0.89
4_a	0.60	0.81	0.78	0.89
5_a	0.72	0.74	0.79	0.83
5_b	0.72	0.76	0.80	0.84
6_a	0.69	0.78	0.89	0.91
7_a	0.65	0.50	0.77	0.76
7_b	0.70	0.50	0.78	0.78
8_b	0.67	0.95	0.87	0.92

10

20

30

## 【0165】

実施例10：血液の血清への処理に関する、高品質なサンプルおよび低品質なサンプルの作製の実験的設計

血漿の品質管理のために同定されたパネルが血清にも適用可能であることを明示的に示すために、20人の健康なボランティアから血液を採取した。

## 【0166】

40

異なる群のサンプルの取扱いは、以下の手順を含んでいた：

- ・血液の長時間凝固
- ・室温における血清の長時間インキュベーション

20人の健康なボランティア(15人の女性、5人の男性)を採用し、ゲージ20セーフティ-フライ血液採取システムを用いる静脈穿刺により、抗凝固剤を含まない2本の採血管に血液を採取した。各被験体の血液を、以下のとおりに異なる群内で処理した。

## 【0167】

対照

各被験体について、1本の採血管を室温で40分間インキュベートし、20 の温度制御遠心分離機中で血清を2000 × gにて20分の遠心分離により調製した。上清血清を新たな管内

50

で穏やかに混合し、分析まで -80 °C にてアリコートで保存した。

【0168】

血液の長時間凝固

各被験体について、1本の採血管を室温で6時間インキュベートし、20 °C の温度制御遠心分離機中で血清を2000 × gにて20分の遠心分離により調製した。新たな管中で上清血清を穏やかに混合し、分析まで -80 °C にてアリコートで保存した。

【0169】

室温における血清の長時間インキュベーション

対照群血清のアリコートを、凍結前に室温で24時間インキュベートし、分析まで -80 °C にて保存した。

10

【0170】

この実験の血清サンプルを、実施例4に記載されるとおり、無作為分析シーケンス設計においてMxP(登録商標)プロードプロファイリングで分析し、その後実施例2に記載されるとおり、プールおよびMxPool(商標)コンセプトで分析した。対照群のサンプルは高品質と見なされ、この実験から得られた他のサンプルは低品質と見なされる。選択されたパネルをそれらの性能について分析して低品質サンプルを同定し、これらを実施例5に記載されるとおり、エラスティックネットアルゴリズムを用いて対照サンプルから識別した。パネル番号は、表1~2に示される代謝産物リストを指す。これらのパネルのAUC推定値は、表6~7に示される。

【0171】

20

【表6】

表6: 分析前交絡因子を検出することによる血清サンプルの品質管理に特に適した代謝産物/マーカーパネルの性能(推定AUC値)。

パネル番号	AUC推定値、エラスティックネット(Elastic Net)、(除くANOVA)
3	0.99990
15	0.99948
16	0.99995
18	0.99495
19	0.99503
20	0.99686

30

【0172】

## 【表7】

表7：分析前交絡因子を検出することによる血清サンプルの品質管理に特に適した最小マーカーパネルの性能(推定AUC値)。

パネル番号	AUC 推定値、エラスティックネット(Elastic Net)、(除く ANOVA)
1_a	0.97566
2_b	0.99035
3_a	0.97746
3_b	0.98802
6_a	0.98185
8_b	0.97303
10_a	0.99218
11_a	0.99368
13_a	0.99393
13_b	0.99133
14_a	0.99795
15_a	0.97722
16_a	0.97866
18_b	0.97386
19_a	0.99364
19_b	0.99611
20_b	0.99900

10

20

30

## 【0173】

実施例11：他のダウンストリーム分析に関する、サンプルの品質管理の適用を示すための実験的設計

本発明に記載される品質管理が、他のダウンストリーム適用(例えばタンパク質分析)にも適用可能であり、さらにバイオバンクサンプルまたは臨床試験サンプルの他の適用への適合性の推定を可能とすることを明らかに示すため、健康なボランティアから血液を採取し、血漿に処理した。

## 【0174】

異なる群のサンプルの取扱いは、以下の手順：

- ・遠心分離前のEDTA血液の長時間インキュベーション
  - ・室温における血漿の長時間インキュベーション
- を含んでいた。

## 【0175】

20人の健康なボランティア(15人の女性、5人の男性)を採用し、ゲージ20のセーフティーフライ血液採取システムを用いる静脈穿刺により、3本のK3EDTA採血管に血液を採取した。以下のとおり、各被験体の血液を異なる群内で処理した。

## 【0176】

対照

各被験体について、1本の採血管を遅滞なく処理し、20 °Cの温度制御遠心分離機で2500 × gにて10分の遠心分離により血漿を調製した。上清血漿を別の遠心分離管に移し、20 °Cの温度制御遠心分離機で16000 × gにて10分再び遠心分離した。上清血漿を新たな管中で穏やかに混合し、分析まで -80 °Cにてアリコートで保存した。

## 【0177】

血液の長時間インキュベーション

各被験体について、1本の採血管を室温で6時間インキュベートし、その後血漿を20 °Cの

40

50

温度制御遠心分離機中で2500 × gにて10分の遠心分離により調製した。上清血漿を別の遠心分離管に移し、20 の温度制御遠心分離機中で16000 × gにて10分、再び遠心分離した。上清血漿を新たな管中で穏やかに混合し、分析まで -80 にてアリコートで保存した。

【0178】

血漿の長時間インキュベーション

各被験体について、1本の採血管を遅滞なく処理し、20 の温度制御遠心分離機中で2500 × gにて10分の遠心分離により血漿を調製した。上清血漿を別の遠心分離管に移し、20 の温度制御遠心分離機中で16000 × gにて10分再び遠心分離した。上清血漿を新たな管中で穏やかに混合し、凍結前に室温で24時間インキュベートし、分析まで -80 にてアリコートで保存した。

10

【0179】

タンパク質を、当業者に周知の、日常的な臨床化学実験室で適用される方法で分析した。これら的方法は、酵素連結免疫吸着アッセイ(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、電気化学発光結合アッセイ(ECLIA)、または他のアッセイを含む。

【0180】

log10変換したタンパク質濃度の対応t検定を用いて統計的分析を実施した。各タンパク質を、血液処理関連交絡群または血漿処理関連交絡群における、その対照群に対する有意差について試験した。結果は表8~9に示される。

【0181】

【表8】

20

表8：血液処理関連分析前変動に対する血漿中タンパク質の感受性

タンパク質	単位	対照に対する、遠心分離の前に室温で6時間保存された血液			
		平均差	平均比	対応t検定のp値	対応t検定のt値
副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)	ng/l	-0.090	0.988	0.2117	-1.2925
抗利尿ホルモン (ADH；バソプレシン)	ng/l	0.635	1.421	0.0063	3.0675
アンギオテンシンII	ng/l	-2.190	0.739	0.7688	0.3030
アルファ-2-HS-糖タンパク質 (AHSG；フェツイン-A)	g/l	0.042	0.995	0.5660	0.5847
ヒトFGF-23c-末端	kRU/l	-1.750	0.996	0.8488	-0.1935
フィブロネクチン	g/l	-0.015	0.959	0.3407	-0.9772
グルカゴン	ng/l	-1.100	0.989	0.1951	-1.3607
インスリン	μU/ml	0.105	1.025	0.2168	1.2777
プロラクチン	ng/ml	0.058	1.009	0.1441	1.5234
副甲状腺ホルモン(PTH)	pmol/l	0.027	1.006	0.5787	0.5650
レニン	pg/ml	-0.026	1.009	0.4337	0.7999
甲状腺刺激ホルモン(TSH)	mU/l	0.004	1.004	0.3896	0.8805

30

40

【0182】

## 【表9】

表9：血漿処理関連分析前変動に対する血漿中タンパク質の感受性

タンパク質	単位	対照に対する、室温で24時間保存された血漿			
		平均差	平均比	対応t検定のp値	対応t検定のt値
副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)	ng/l	-1.365	0.932	5.9357E-09	-9.9255
抗利尿ホルモン(ADH；バソプレシン)	ng/l	0.455	1.308	0.0095	2.8841
アンギオテンシンII	ng/l	6.515	1.079	0.0009	4.8809
アルファ-2-HS-糖タンパク質(AHSG；フェツイン-A)	g/l	0.058	1.024	0.0299	2.3585
ヒトFGF-23c-末端	kRU/l	-4.900	0.916	0.3958	-0.8741
フィブロネクチン	g/l	-0.020	0.920	0.1011	-1.7229
グルカゴン	ng/l	10.450	1.307	0.4426	-0.7902
インスリン	μU/ml	-0.070	0.991	0.0789	-1.8566
プロラクチン	ng/ml	0.020	1.002	0.6555	0.4532
副甲状腺ホルモン(PTH)	pmol/l	0.087	1.027	0.0601	1.9989
レニン	pg/ml	-1.188	0.938	5.7391E-06	-6.2122
甲状腺刺激ホルモン(TSH)	mU/l	0.004	1.004	0.0958	1.7527

## 【0183】

表8および9のデータは、本発明の方法により低品質なサンプルとして同定されるサンプルが、試験したタンパク質の活性および/または濃度において有意な変化を示し、その結果、例えば、診断目的またはプロテオミクス目的には不十分な品質であることを示す。

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/IB2015/052243															
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> G01N 33/574(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																	
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N 33/- Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched																	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPI, EPODOC, CNKI, CNPAT, NCBI PubMed, GOOGLE Scholar, ISI Web of Knowledge, STN, metanomics Health GmbH, BASF, glycerate?, ornithine?, glycerol-3-phosphate, hypoxanthine, blood, device																	
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">WO 2010139711 A1 (METANOMICS HEALTH GMBH. ET AL.) 09 December 2010 (2010-12-09) claims 1, 7, 18-20; description, page 6, lines 30-33; page 13, lines 25-43; page 21, lines 35-42</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-19</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">A</td> <td style="padding: 2px;">CN 103512972 A (UNIV. SHANGHAI JIAOTONG) 15 January 2014 (2014-01-15) claims 1-10</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-19</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">A</td> <td style="padding: 2px;">CN 102652261 A (HOFFMANN LA ROCHE. &amp; CO. AG F.) 29 August 2012 (2012-08-29) claims 1-15</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-19</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">A</td> <td style="padding: 2px;">WO 2010101564 A1 (WAN JOHN ET AL.) 10 September 2010 (2010-09-10) claims 1-9</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1-19</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	WO 2010139711 A1 (METANOMICS HEALTH GMBH. ET AL.) 09 December 2010 (2010-12-09) claims 1, 7, 18-20; description, page 6, lines 30-33; page 13, lines 25-43; page 21, lines 35-42	1-19	A	CN 103512972 A (UNIV. SHANGHAI JIAOTONG) 15 January 2014 (2014-01-15) claims 1-10	1-19	A	CN 102652261 A (HOFFMANN LA ROCHE. & CO. AG F.) 29 August 2012 (2012-08-29) claims 1-15	1-19	A	WO 2010101564 A1 (WAN JOHN ET AL.) 10 September 2010 (2010-09-10) claims 1-9	1-19
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.															
X	WO 2010139711 A1 (METANOMICS HEALTH GMBH. ET AL.) 09 December 2010 (2010-12-09) claims 1, 7, 18-20; description, page 6, lines 30-33; page 13, lines 25-43; page 21, lines 35-42	1-19															
A	CN 103512972 A (UNIV. SHANGHAI JIAOTONG) 15 January 2014 (2014-01-15) claims 1-10	1-19															
A	CN 102652261 A (HOFFMANN LA ROCHE. & CO. AG F.) 29 August 2012 (2012-08-29) claims 1-15	1-19															
A	WO 2010101564 A1 (WAN JOHN ET AL.) 10 September 2010 (2010-09-10) claims 1-9	1-19															
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.																	
* Special categories of cited documents: “ <b>A</b> ” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance “ <b>E</b> ” earlier application or patent but published on or after the international filing date “ <b>L</b> ” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) “ <b>O</b> ” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means “ <b>P</b> ” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed “ <b>T</b> ” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention “ <b>X</b> ” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone “ <b>Y</b> ” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art “ <b>&amp;</b> ” document member of the same patent family																	
Date of the actual completion of the international search <b>04 June 2015</b>		Date of mailing of the international search report <b>23 June 2015</b>															
Name and mailing address of the ISA/CN <b>STATE INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE OF THE P.R.CHINA 6, Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing 100088, China</b>		Authorized officer <b>TU,Haihua</b>															
Facsimile No. <b>(86-10)62019451</b>		Telephone No. <b>(86-10)62413749</b>															

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members				International application No. PCT/IB2015/052243					
Patent document cited in search report		Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)				
WO	2010139711	A1	09 December 2010	JP	2012529021	A			
				EP	2804001	A2			
				EP	2804001	A3			
				EP	2438445	B1			
				US	2012122243	A1			
				ES	2516866	T3			
				EP	2438445	A1			
				CA	2764049	A1			
				DE	112010002253	T5			
				CN	102483416	A			
CN				15 November 2012 19 November 2014 14 January 2015 16 July 2014 17 May 2012 31 October 2014 11 April 2012 09 December 2010 03 January 2013 30 May 2012					
CN				None					
CN	102652261	A	29 August 2012	US	2012252035	A1			
				EP	2336784	A1			
				WO	2011073382	A1			
				CA	2778873	A1			
				JP	2013514528	A			
WO	2010101564	A1	10 September 2010	ES	2529094	T3			
				EP	2344623	B1			
				CA	2728379	A1			
				AU	2009341554	A2			
				AU	2009341554	A1			
				EP	2344623	A1			
				JP	2012519845	A			
				EP	2344623	A4			
				JP	5416227	B2			
				16 February 2015 19 November 2014 10 September 2010 07 July 2011 10 September 2010 20 July 2011 30 August 2012 30 November 2011 12 February 2014					

---

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,D0,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(74)代理人 100188271

弁理士 塚原 優子

(72)発明者 カムラゲ, ピエテ

ドイツ連邦共和国 12161 ベルリン, ヴァルツィナー シュトラーセ 13 / 14

(72)発明者 シュミツツ, オリバー

ドイツ連邦共和国 14624 ダルゴウ - デーベリツツ, ヨハネス - ブラームス - シュトラーセ  
16

(72)発明者 ベッサン, ピアンカ

ドイツ連邦共和国 10717 ベルリン, イエーナアー シュトラーセ 29

(72)発明者 シャツツ, フィリップ

ドイツ連邦共和国 10435 ベルリン, オーダーベルガー シュトラーセ 46

(72)発明者 ペーター, エーリク

ドイツ連邦共和国 14473 ポツダム, フンボルtring 13

F ターム(参考) 2G045 CA25 CA26 DA31 DA35 FA03 FA06 JA01